

Herpes virus recombinant pox virus vaccine

in my patents list

Inventor:

Applicant: HEALTH RES
(US)

EC: C07K14/03; C07K14/03B;
(+6)

IPC: C07K14/03; C07K14/035;
C07K14/045 (+9)

Publication Info: **NL99000034** - 2003-10-01

Publication number:

NL99000034 ✓

Publication date:

2003-10-01

Inventor:

Applicant:

HEALTH RES (US)

Classification:

International:

C07K14/03; C07K14/035; C07K14/045; C07K14/05; C12N15/863; A61K39/00; C07K14/005;
C12N15/863; A61K39/00; (IPC-1-7): C12N15/38; A61K39/275; C07K14/065

European:

C07K14/03; C07K14/03B; C07K14/035; C07K14/045; C07K14/05; C12N15/863; C12N15/863A;
C12N15/863V

Application number:

NL19990000034 20030702

Priority number(s):

NL19990000034 20030702; NL19900020677 19900416; US19890339004 19890417;
US19890394488 19890816; US19900502834 19900404

View INPADOC patent family

Abstract of NL99000034

Recombinant poxvirus contains DNA from equine herpes virus in a non-essential region of its genome. Pref. this DNA encodes equine herpes virus glycoprotein, esp. gp. 13 and/or gp. 14. The poxvirus is pref. vaccinia or an avipox virus esp. fowlpox or canary poxvirus. Vaccines comprising the recombinant poxvirus and a suitable carrier are also claimed. Recombinant poxvirus contg. other herpes virus DNA are also claimed. Specifically the herpes virus DNA encodes one of pseudorabies virus gp50, gpII gpIII, gpI; herpes simplex virus gD; bovine herpes virus gI; feline herpes virus gB, Epstein-Barr virus gB, gH and human cytomegalovirus gB glycoproteins. Corresg. vaccines are claimed. Maternal immunity in a newborn offspring is avoided by inoculating with recombinant poxvirus contg. foreign DNA encoding a first antigen of a pathogen of the offspring, this Ag being different from a second Ag of the same pathogen used to induce an immunological response in the mother.

(19)



Octrooiraad
Nederland

(11) 9900034

(12) A TERINZAGELEGGING

(21) Aanvraag om octrooi: 9900034

(22) Ingediend: 02.07.2003

(62) Afsplitsing (art. 8a ROW) van aanvraag 9020677,
Ingediend 16.04.1990

(51) Int.Cl.⁷

C12N15/38, C07K14/065, A61K39/275

(30) Voorrang:
17.04.1989 US 339004
16.08.1989 US 394488
04.04.1990 US 502834

(43) Ter inzage gelegd:
01.10.2003 i.e. 2003/10

(71) Aanvrager(s):
HEALTH RESEARCH, INCORPORATED te
Albany, New York, Verenigde Staten van
Amerika (US).

(74) Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

(54) Herpesvirus recombinant pokkenvirus.

- (57) De uitvinding heeft betrekking op een recombinant pokkenvirus dat daarin DNA van kat herpesvirus bevat. Bij voorkeur is het DNA aanwezig in een niet-essentieel gebied van het pokkenvirusgenoom. Bij voorkeur bevat het pokken-virus verder een promotor voor het tot expressie brengen van het DNA. Bij voorkeur is het pokkenvirus een vaccinia virus of een vogelpokkenvirus, in het bijzonder een pluimveepokkenvirus of een kanariepokkenvirus. Bij voorkeur codeert het DNA voor een kat herpesvirus glycoproteïne. Bij voorkeur codeert het DNA voor, of omvat het kat herpesvirus glycoproteïne, kat herpesvirus gB. Verder heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het produceren van een kat herpesvirus glycoproteïne, op een gebruik van voornoemd pokkenvirus bij de bereiding van een immunogene of vaccin-samenstelling tegen kat herpesvirus, en op een samenstelling die en op een vaccin dat voornoemd pokkenvirus omvat.

NL A 9900034

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

5

10

Herpesvirus recombinant pokkenvirus.

Verwijzing naar verwante octrooiaanvragen.

15

Deze octrooiaanvraag is een continuation-in-part van de op 16 augustus 1989 ingediende Amerikaanse octrooiaanvraag 394.488, die weer een continuation-in-part van de op 17 april 1989 ingediende Amerikaanse octrooiaanvraag

20

339.004 is.

Gebied van de uitvinding.

25

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een gemodificeerd pokkenvirus en op methoden om dit te bereiden en te gebruiken. De uitvinding heeft in het bijzonder betrekking op recombinant pokkenvirus, welk virus genproducten van een herpesvirusgen tot expressie brengt en op vaccins die een beschermende immuniteit tegen herpesvirusinfecties geven.

30

In deze aanvraag zijn vele publikaties met arabishe cijfers zonder haken aangegeven. Een volledige vermelding van deze referenties is te vinden aan het einde van de beschrijving, direct voor de conclusies. Deze referenties

35

beschrijven de stand der techniek waarop deze uitvinding betrekking heeft.

Achtergrond van de uitvinding.

- Vaccinia virus en recenter andere pokkenvirussen zijn toegepast voor het invoegen en tot expressie brengen van vreemde genen. De basistechniek voor het invoeren van vreemde genen in levend infectueus pokkenvirus brengt recombiantie van pokken DNA volgorden die een vreemd genetisch element in een donorplasmide flankeren en homologe volgorden aanwezig in het reddende pokkenvirus (28) met zich mede.
- Specifiek worden de recombinant pokkenvirussen volgens twee, uit de stand der techniek bekende methoden geconstrueerd, analoog aan de methoden voor het verkrijgen van synthetische recombinanten van het vacciniavirus, beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 4.603.112.
- Allereerst wordt de in het virus in te voegen DNA genvolgorde, in het bijzonder een open afleesraam uit een niet-pokkenbron, geplaatst in een E. coli plasmideconstructie waarin DNA homoloog aan een gedeelte van het DNA van het pokkenvirus is ingevoegd. Afzonderlijk wordt de DNA genvolgorde die moet worden ingevoegd gebonden aan een promotor. De promotor-genbinding wordt geplaatst in de plasmideconstructie, zodanig dat de promotor-genbinding aan beide uiteinden wordt geflankeerd door DNA homoloog aan een DNA volgorde die een gebied van pokken DNA die een niet-essentieel gebied bevat flankeert. De verkregen plasmideconstructie wordt daarna door groei in E. coli bacteriën (11) vermeerderd en geïsoleerd (12, 20).
- Ten tweede wordt het geïsoleerde plasmide dat de in te voegen DNA genvolgorde bevat door transfectie overgebracht in een celcultuur, bijvoorbeeld kippenembryo-fibroblasten, tezamen met het pokkenvirus. Recombinatie tussen respectievelijk homoloog pokken DNA in het plasmide en het virale genoom geeft een pokkenvirus dat door de aanwezigheid, in een niet-essentieel gebied van het genoom ervan, van vreemde DNA volgorden is gemodificeerd. De aanduiding "vreemd" DNA duidt op exogeen DNA, in het bijzonder DNA uit een niet-pokkenbron, dat codeert voor genprodukten die niet

gewoonlijk worden geproduceerd door het genoom waarin het exogene DNA is gebracht.

Genetische recombinatie is in het algemeen de uitwisseling van homologe gedeelten van het DNA tussen twee DNA strengen. In bepaalde virussen kan RNA DNA vervangen. Homologe gedeelten van het nucleïnezuur zijn nucleïnezuur-gedeelten (DNA of RNA) die dezelfde volgorde van nucleotidenbasen bezitten.

Genetische recombinatie kan natuurlijk tijdens de replicatie of bereiding van nieuwe virale genomen in de geïnfecteerde gastheercel plaats vinden. Zo kan dus genetische recombinatie tussen virale genen tijdens de virale replicatiecyclus die plaats vindt in de gastheercel die geco-infecteerd is met twee of meer verschillende virussen van andere genetische constructies plaats vinden. Een gedeelte van het DNA uit een eerste genoom wordt onderling uitwisselbaar toegepast voor de constructie van het gedeelte van het genoom van een tweede co-infecterend virus, waarin het DNA homoloog is aan dat van het eerste virale genoom.

Recombinatie kan echter eveneens plaatsvinden tussen delen van het DNA in verschillende genomen die niet perfect homoloog zijn. Indien een dergelijk gedeelte van een eerste genoom homoloog is met een gedeelte van een ander genoom, afgezien van de aanwezigheid in het eerste gedeelte van bijvoorbeeld een genetische marker of een gen coderend voor een antigene determinant ingevoegd in een gedeelte van het homologe DNA, kan recombinatie toch plaats vinden en de produkten van deze recombinatie kunnen dan worden aangetoond door de aanwezigheid van die genetische marker of gen in het recombinant virale genoom.

Een succesvolle expressie van de ingevoegde DNA genetische volgorde door het gemodificeerde infectieuze virus hangt van twee factoren af. Ten eerste moet het ingevoegen plaatsvinden in een niet-essentieel gedeelte van het virus opdat het gemodificeerde virus levensvatbaar blijft. De tweede voorwaarde voor de expressie van het

ingevoegde DNA is de aanwezigheid van een promotor in het juiste verband met het ingevoegde DNA. De promotor moet zodanig zijn geplaatst dat het stroomopwaarts van de tot expressie te brengen DNA volgorde aanwezig is.

5 Er zijn twee ondertypen van paard herpesvirus, die, hoewel ze kruis-neutraliserende epitopen bevatten, kunnen worden onderscheiden door hun antigene profielen, restrictieëendonuclease vingerafdrukken en hun pathogeni-
10 teit voor paarden (1). Paard herpesvirus 1 (EHV-1) is geassocieerd met een ziekte van het ademhalingsstelsel, aandoeningen van het centrale zenuwstelsel en klassieke herpetische afwijkingen, terwijl het paard herpesvirus 4 (EHV-4) overwegend geassocieerd is met een ziekte van het
15 ademhalingsstelsel (1, 48). Paard herpesvirussen zijn leden van de α -herpesvirusonderfamilie en vertonen vele van de typerende biologische en biochemische kenmerken van humane herpesvirussen, zoals genomische isomerisatie, regulering van de genexpressie, het verkrijgen van latente infecties, ontwikkeling van onvolkomen interfererende virusdeeltjes,
20 inductie van neurologische aandoeningen en in vitro oncogene transformatie (1, 4, 23). EHV kan dus geschikt worden toegepast voor het onderzoek van de verschillende biologische consequenties van herpesvirusinfecties.

Herpesvirus glycoproteïnen mediëren essentiële
25 virale functies, zoals de aanhechting van cellen en de penetratie van cellen, de van cel tot cel verspreiding van het virus en, hetgeen belangrijk is, bepaling van het pathogeniteitsprofiel van de infectie. Herpesvirus glycoproteïnen zijn kritische bestanddelen bij de interactie met
30 het immuunsysteem van de gastheer (36,37).

Onder de goed gekarakteriseerde glycoproteïnen van het herpes simplex virus vallen gB, gC, gD, gE, gG, gH en gI (36,37,49-55). Een aantal van deze onderzoeken heeft
35 het belang van herpes simplex virusglycoproteïnen bij het opwekken van immuunresponsen aangegeven. Zo is vermeld dat gB en gD belangrijke immuunresponsen kunnen opwekken (6,8,13,18,21,22,26,27,30,44,46,47). gC kan klasse I

beperkte cytotoxische lymfocyten stimuleren (15,32), terwijl gD klasse II cytotoxische T celresponsen kan stimuleren (21,22,44,46,47). Aangetoond werd dat gG een doelwit was voor complement-afhankelijke, op antilichamen gerichte virusneutralisatie (38,39). Eveneens werd aangetoond dat een aantal glycoproteïnen uit andere herpes virussen belangrijke immuunresponsen opwekken (5,10,36,56).

Beide ondertypen van EHV brengen zes overvloedige glycoproteïnen tot expressie (1,3,43). De genome gedeelten van de DNA volgorden coderende voor gp2, gp10, gp13, gp14, gp17/18 en gp21/22a zijn bepaald onder toepassing van lambda gt11 expressie-vectoren en monoklonale antilichamen (3). De glycoproteïnen gp13 en gp14 zijn aanwezig in dezelfde lokaties in de L component van het genoom waartoe respectievelijk de gC en gB homologen van de herpes simplex virusmap behoren (3). EHV-1 schijnt uniek onder de alfa herpesvirussen waarvan de glycoproteïne genen in kaart zijn gebracht te zijn omdat vijf van de zes hoofdglycoproteïnen ervan zijn gecodeerd uit volgorden in het genoom L component, terwijl slechts één (gp17/18) in kaart is gebracht in het U₁ gebied. Deze gegevens analyserend, werd voorspeld dat enkele van de low-abundance glycoproteïnen geïdentificeerd in EHV-1 virusdeeltjes evenals EHV-1 glycoproteïnen die nog niet zijn geïdentificeerd behoren tot de S component van het genoom (3). De envelop glycoproteïnen zijn de belangrijkste immunogenen van herpesvirussen die betrokken zijn bij het opwekken van zowel humorale als cellulaire gastheerimmuunresponsen (5,8,73-75) en zijn aldus van het grootste belang voor diegenen die vaccins ontwikkelen.

Onlangs is de nucleotidevolgorde van de Kentucky T431 stam van de EHV-1 transcriptionale eenheid coderende voor gp13 vermeld (2). Een open afleesframe codeert voor een 468 aminozuren bevattend primair translatieprodukt van 51 kDa. Het eiwit heeft de karakteristieke eigenschappen van een membraan-spanning eiwit met negen potentiële N-verknoopte glycosyleringsplaatsen (Asn-X-Ser/Thr) aanwezig in het oppervlaktegebied tussen het veronderstelde signaal

en transmembraanankergedeelten van het eiwit (2). Het glycoproteïne bleek homoloog aan het herpes simplex virus (HSV) gC-1 en gC-2, het pseudorabies virus (PRV) gIII en het varicella-zoster virus (VZV) gpV (2) te zijn. EHV-1
5 gp13 is dus het structurele homoloog van de herpes virus gC-achtige glycoproteïnen.

Onlangs is de nucleotidevolgorde van EHV-1 gp14 (71,72) vermeld. Analyse van de voorspelde aminozuurvolgorde van het gp14 glycoproteïne onthulde een significante
10 homologie met het overeenkomstige glycoproteïne van HSV, gB.

Monoklonale antilichamen die gericht zijn tegen enkele EHV-1 glycoproteïnen bleken neutraliserend te zijn (76). Uit passieve immunisatieonderzoekingen bleek dat
15 monoklonale antilichamen gericht tegen gp13 of gp14 (77) of tegen gp13, gp14 of gp17/18 (78) hamsters konden beschermen tegen een letale provocatie. Andere gB en gC glycoproteïne-analoga zijn eveneens betrokken bij de bescherming tegen ziekten veroorzaakt door alfa herpesvirussen (8,10, 73).
20 Het EHV-1 gp17/18 glycoproteïne, hoewel gekarakteriseerd als een ander potentieel beschermend immunogeen, had tot nu toe geen bekende structurele tegenhanger onder de vele glycoproteïnen gecodeerd uit het S-bestanddeel in de andere alfaherpesvirussen (66,79,80). Op basis van de genomische
25 plaats ervan, werd gespeculeerd dat gp17/18 het HSV gE analogon zou zijn (2).

Pseudorabies virus (PRV), een alfaherpesvirus, is de veroorzaker van de ziekte van Aujeszky. De ziekte is zeer infectueus en veroorzaakt ernstige economische verliezen in
30 de varkensindustrie. De ziekte gaat gepaard met een grote morbiditeit en mortaliteit onder de biggetjes en is gekenmerkt door ernstige ziekte van de ademhalingswegen, miskramen, kleinere afmeting van de jongen en kleinere groeiselheden van de overlevenden. Fatale encefalitis is een
35 vaak voorkomend gevolg van de infectie. Latente virale infecties, een kenmerk van herpesvirussen, kunnen worden vastgesteld en maken het dus mogelijk om herstellende volwas-

sen varkens te laten dienen als chronische dragers van het virus. Voor een recent uitgebreid overzicht zie Wittmann en Rziha (81).

Het PRV genoom bestaat uit 90×10^6 dalton dubbelstrengs DNA (82) gescheiden door omgekeerde, zich herhalende eenheden in uniek lange (U_L) of uniek korte (U_S) segmenten (83,84). Het PRV genoom codeert voor ongeveer 100 polypeptiden waarvan de expressie wordt geregeld op een cascade-achtige wijze, analoog aan andere herpesvirussen (85,86). Tot op heden is van vijf glycoproteïnen gpI, gpII, gpIII, gp63 en gp50 aangetoond dat ze geassocieerd zijn met de virale envelop en geassocieerd zijn met de verschillende membraanstructuren van met PRV geïnfecteerde cellen (80,86-91). Een zesde door PRV gecodeerd glycoproteïne (gX) wordt in het cultuurmedium vrijgemaakt (92). De fysische lokatie van deze glycoproteïnen op het PRV genoom en hun DNA volgorde zijn tegenwoordig bekend (62,80,91-98). Zoals bij de glycoproteïnen van andere herpesvirussen, mediëren de PRV glycoproteïnen essentiële virale functies, zoals cellulaire hechting aan en penetratie in of vrijmaking uit de cellen. De PRV glycoproteïnen zijn kritisch in het pathogeniciteitsprofiel van de PRV infectie en zijn kritische bestanddelen bij het genezen van de ziekte en de immunustatus.

PRV gpI is niet-essentieel voor de virusreproductie (in vitro en in vivo) en ontbreekt in de meest verzwakte PRV stammen (99). De verzwakte aard van deze gI-gedeleteerde stammen geeft eveneens een mogelijke rol voor gI bij virulentie aan (99,100). Andere PRV eiwitten schijnen echter bij deze functie te zijn betrokken, aangezien expressie van gI alleen niet voldoende is om een hoge mate van virulentie te geven (100).

De rol die gI speelt bij het opwekken van een immunrespons tegen PRV is onduidelijk. Monoklonale antilichamen tegen gI kunnen het virus in vitro neutraliseren (101) en passief geïmmuniseerde muizen tegen een letale PRV provocatie beschermen (81). Kost en medewerkers (98) hebben

onlangs de expressie van PRV gpI in vaccinia virus recombinanten, hetzij alleen, hetzij tezamen met gp50 en gp63, beschreven. Inenting via de schedel van de vaccinia recombinanten bij muizen leidde tot een verhoogde virulentie, in
5 het bijzonder indien PRV gpI was geassocieerd met co-expressie van gp50 en gp63.

Bij varkens worden echter geen neutraliserende antilichamen tegen gI geproduceerd (5). Bovendien beschermt een recombinant vaccinia virus dat PRV gI-gecodeerde
10 polypeptiden (98) tot expressie brengt geen muizen tegen een letale PRV provocatie (ten opzichte van de bescherming die verkregen werd met de vaccinia virus blanco van het wilde type). Deze gegevens, samengenomen, suggereren dat PRV gpI geschikter als diagnostische probe is dan als een
15 bestanddeel in een sub-eenheidsvaccin.

Het PRV glycoproteïne gp63 is naast gp50 in het U_s gebied van het PRV genoom geplaatst (80). De coderende volgorde voor PRV gp63 begint met drie op elkaar volgende ATG codons ongeveer 20 nucleotiden stroomafwaarts van het
20 stopcodon van gp50. Er is geen herkenbaar transcriptioneel signaal motief en translatie vindt waarschijnlijk plaats uit hetzelfde transcript als gp50. PRV gp63 is in vitro niet essentieel. PRV gp63 als een continue DNA volgorde met PRV gp50 is tot expressie gebracht in vaccinia virus, zoals
25 is beschreven door Kost en medewerkers (98). De bijdrage van PRV gp63 aan de bescherming van muizen tegen de PRV provocatie is moeilijk te beoordelen, aangezien deze onderzoeken niet de bijdragen van PRV gp50 en gp63 onderscheiden.

PRV glycoproteïne gX is een niet-structureel glycoproteïne waarvan het eindproduct wordt afgescheiden in de extracellulaire vloeistof (85,92). Er werd geen in vitro neutralisatie van PRV verkregen met hetzij polyklonale of
30 monoklonale sera voor PRVgX (102,103) en sub-eenheid gX vaccins waren niet beschermend tegen provocatie (104).

PRV glycoproteïne gp50 is het Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) gD analogon (97). Het DNA open afleesframe

codeert voor 402 aminozuren (95). De rijpe geglycosyleerde vorm (50-60 kDa) bevat O-gebonden koolhydraat zonder N-gebonden glycosylering (95). Varkensserum is zeer reactief met PRV gp50, hetgeen het belang ervan als immunogeen suggereert. Monoklonale antilichamen voor gp50 neutraliseren in vitro PRV met of zonder complement (97,105,106) en beschermen passief muizen (102,105,106) en varkens (102). Vaccinia virus recombinanten die PRV gp50 tot expressie brengen induceren serumneutraliserende antilichamen en beschermen zowel muizen als varkens tegen letale PRV provocatie (98,107,108).

Het PRV gpIII gen is geplaatst in het U_L gebied van het genoom. Het 1437 bp open afleesframe codeert voor een eiwit met 479 aminozuren. Het 50,9 kDa gededuceerde primaire translatieproduct heeft acht potentiële, met N-gebonden glycosyleringsplaatsen (96). PRV gIII is het HSV-1 gC analogon (96). Functionele vervanging van PRV gIII door HSVgC werd niet waargenomen (109). Hoewel PRV gIII niet-essentieel voor replicatie in vitro is (110,111), is de rijpe geglycosyleerde vorm (98 kDa) een overbodig bestanddeel van de PRV envelop. Anti-gpIII monoklonale antilichamen neutraliseren het virus in vitro met of zonder complement (86,106,110) en kunnen passief muizen en varkens (102) beschermen. Het PRV glycoproteïne gIII kan muizen en varkens tegen letale PRV provocatie beschermen na immunisatie met een Cro/gIII fusie proteïne, tot expressie gebracht in E.coli (Robbins, A., R. Watson, L. Enquist, Europese octrooiaanvraag 0162738A1) of tot expressie gebracht in een vaccinia recombinant (Panicali, D., L. Gritz, G. Mazzara, Europese octrooiaanvraag 0261940A2).

Een van de belangrijkste bestanddelen van de PRV envelop is een via een disulfide verknoopt complex van drie glycoproteïnen (120 kDa, 67 kDa en 58 kDa) volgens de nomenclatuur van Hampl (86) aangeduid als PRV gpII. De DNA volgorde coderend PRV gpII is geplaatst aan het linker uiteinde van U_L. Het open afleesframe van 2976 nucleotiden codeert voor een primair translatieproduct van 913 aminozu-

- ren of 110 kDa. PRV gpII is het HSV-1 gB homoloog (62). Aangetoond is dat monoklonale antilichamen gericht tegen PRV gpII het virus in vitro (5) met of zonder complement (81) neutraliseren. Bovendien demonstreren passieve immunisatieonderzoekingen dat neutraliserende monoklonale antilichamen ten dele varkens beschermen doch faalden muizen tegen virulente virusprovocatie te beschermen (102). Tot nu toe is nog geen actieve immunisatie van varkens met PRV gpII glycoproteïne gemeld.
- 10 Gedurende de laatste 20 jaren is het voorkomen van genitale infecties veroorzaakt door het herpes simplex virus type 2 (HSV2) aanzienlijk toegenomen. Recente schattingen geven aan dat in de Verenigde Staten 5-20 miljoen mensen genitale herpes hebben (112). Hoewel gebleken is dat
- 15 orale behandeling met acyclovir de ernst van primaire infecties vermindert (113) en zich herhalende episoden onderdrukt (114), is de bestrijding en de behandeling van deze infecties verre van ideaal. Daarvoor is een vaccin ter vermindering van primaire en zich herhalende infecties
- 20 nodig.
- Het herpes simplex virus type 1 (HSV1) genoom codeert voor ten minste acht antigeen verschillende glycoproteïnen: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI en gJ (115). Homologen voor deze genen schijnen aanwezig te zijn in HSV2 (116-119). Aangezien deze glycoproteïnen zowel in de virion
- 25 envelop als in het geïnfecteerde celplasmamembraan aanwezig zijn, kunnen ze humorale en via een cel gemedieerde, beschermende immuunresponsen geven (37).
- Het relatieve belang van humorale en cellulaire
- 30 immuniteit bij de bescherming tegen herpes simplex virusinfecties is niet volledig opgehelderd. Muizen die met gezuiverd HSV1 gB, gC of gD waren geïmmuniseerd zijn beschermd tegen letale HSV1 provocatie (120). Muizen zijn eveneens beschermd tegen letale HSV1 of HSV2 provocatie
- 35 door passieve immunisatie met antilichamen tegen het totale HSV1 (121) of HSV2 (122) virus en met antilichamen tegen de individuele HSV2 gB, gC, gD of gE glycoproteïnen (123).

Deze bescherming schijnt echter afhankelijk te zijn van een competente T-celrespons, aangezien dieren waarvan de immuniteit was onderdrukt door bestraling, cyclofosfamide of anti-thymocytenserum niet werden beschermd (124).

- 5 De bijdragen van de afzonderlijke glycoproteïnen bij het opwekken van een beschermende immuunrespons is niet volledig opgehelderd. Expressie van deze glycoproteïnen in een heteroloog systeem, zoals vaccinia, heeft het mogelijk gemaakt dat enkele van deze parameters werden geanalyseerd.
- 10 Zo is bijvoorbeeld gebleken dat vaccinia virus vectoren die HSV1 gB (125) en HSV1 gC (32) tot expressie brengen cytotoxische T-celresponsen induceren. Bovendien is gebleken dat muizen geïmmuniseerd met recombinant vaccinia virus, die tot expressie brengen hetzij HSV1 gB (8), HSV1 gC (126)
- 15 of HSV1 gD (26) beschermd zijn tegen een letale provocatie van HSV1. Een recombinant vaccinia virus dat HSV1 gD tot expressie brengt blijkt eveneens beschermend ten opzichte van HSV2 in een guinees biggetje modelsysteem te zijn (44). Het is echter niet bekend of expressie van vele HSV antigenen tot een potentiëring van deze beschermende respons zal leiden.
- 20

- Runder herpesvirus 1 (BHV1) is verantwoordelijk voor verschillende ziekten bij vee, waaronder conjunctivitis, vulvovaginitis en miskraam (127). Het is eveneens één
- 25 van de meest belangrijke veroorzakers van de ademhalingsziekte bij rundvee, hetzij rechtstreeks werkende, hetzij als een van de voren vatbaar makende factor voor bacteriële infectie (128).

- Een specificatie van BHV1 omvat meer dan 30
- 30 structurele polypeptiden, waarvan 11 geglycosyleerd zijn (129). Vier van deze glycoproteïnen, gI, gII, gIII en gIV, zijn gekarakteriseerd en bleken homolog aan de herpes simplex virus (HSV) glycoproteïnen gB, gC, gD en gE te zijn (130,131).

- 35 Sub-eenheidvaccins die uit gI, gIII en/of gIV bestaan bleken vee tegen ziekte (onder toepassing van een BHV1/Pasteurella hemolytica aerosol provocatiemodel) te

beschermen, doch niet tegen infectie (132). Uit deze resultaten blijkt het belang van deze glycoproteïnen bij het opwekken van een succesvolle immuunrespons tegen BHV1.

- 5 gI en gIII zijn eveneens gekloond in vaccinia virus en het is gebleken dat vee dat met deze recombinanten is geïmmuniseerd neutraliserende antilichamen tegen BHV1 produceren (56,133).

- Katten rhinotracheïtis is een gebruikelijke en over de hele wereld voorkomende ziekte van katten die wordt
10 veroorzaakt door een α herpesvirus, aangeduid als feline herpesvirus type 1 (FHV-1). Evenals andere herpesvirussen, geeft FHV-1 een latente infectie die leidt tot een periodieke reactivering (134). FHV-1 infecties bij gefokte koloniën worden gekenmerkt door een hoog mortaliteitspercentage bij poesjes. Secundaire infecties van het bovenste
15 gedeelte van het ademhalingsstelsel zijn tamelijk verzwakend bij de volwassen dieren. De bestrijding van deze ziekte geschiedt tegenwoordig door gebruik te maken van gemodificeerde levende of geïnactiveerde vaccins die de
20 ontwikkeling van klinische signalen kunnen onderdrukken, doch niet infectie, die leidt tot verspreiding van het virus, kan verhinderen. Zo kunnen dus asymptomatisch gevaccineerde katten virulent virus verspreiden en latente infecties kunnen niet worden verhinderd door de bestaande
25 vaccins (135) of met de veiliger, gezuiverde sub-eenheidvaccins die onder ontwikkeling zijn (136,137).

- Herpesvirus glycoproteïnen mediëren het hechten van het virion aan de gastheercel en zijn uiterst belangrijk bij virale infecties (138,139). Ze bepalen eveneens de
30 sub-type specificiteit van het virus (110). Herpesvirus glycoproteïnen antigenen worden herkend door zowel de humorale als cellulaire immuunsystemen en het is gebleken dat ze beschermende immuunresponsen bij gevaccineerde gastheren opwekken (44,107,141,142). FHV-1 bleek ten minste
35 23 verschillende eiwitten te bevatten (143,144). Hiervan zijn ten minste vijf geglycosyleerd (144,145) met vermelde moleculaire massa's variërende van 120 kDa tot 60 kDa. De

FHV-1 glycoproteïnen bleken immunogeen te zijn (143,145).

Evenals vele andere α -herpesvirussen, bleek FHV-1 een homoloog van glycoproteïne B (gB) van HSV-1 te hebben en een gedeeltelijke volgorde van het FHV-1 gB gen is onlangs beschreven (146). Het HSV-1 gB is nodig voor de virusintrade en voor de celfusie (147-149). Het HSV-1 gB en de gB analoga van andere herpesvirussen bleken belangrijke circulerende antilichamen evenals cel-gemedieerde immun-responsen op te wekken (8,10,37,47,73,150). Het FHV-1 gB glycoproteïne is een 134 kDa complex dat met B-mercapto-ethanol wordt gedissocieerd in twee glycoproteïnen van 66 kDa en 60 kDa. Het FHV-1 DNA genoom heeft een afmeting van ongeveer 134 Kb (153).

Epstein Barr virus (EBV), een humaan B lymfotro-pisch herpesvirus, is een lid van de genus lymfocryptovirus die behoort tot de sub-familie γ -herpesvirus (115). Het is de veroorzaker van infectueuze mononucleosis (154) en van B-cel lymfomas (156). EBV is geassocieerd met twee humane kwaadaardige ziekten, het endemische Burkitt's lymfoma en het niet-gedifferentieerde nasofaryngeale carcinoom (156).

Sinds het EBV genoom volledig is gesequenceerd (207) als de genomen VZV (66) en HSV1 (158), zijn talrijke homologieën tussen deze verschillende herpesvirussen beschreven (159). In enkele gevallen zijn deze homologieën toegepast voor de voorspelling van de potentiële functies van enkele open afleesframe (ORFs) van EBV. De EBV genen homoloog aan de HSV1 genen betrokken bij immuniteit zijn van bijzonder belang. Zo heeft het EBV BALF4 gen homologieën met HSV1 gB (68) en het EBV BXLF2 gen met HSV1 gH (161). Tenslotte bevat het EBV BBRF3 gen homologieën met een CMV membraaneiwit (162).

Van de EBV eiwitten, zijn de twee belangrijkste envelop glycoproteïnen gp340 en gp220 de best gekarakteriseerde potentiële vaccinerende antigenen. Zij zijn afgeleid van hetzelfde gen door splicing, zonder een verandering van het afleesframe (163,164). Monoklonale antilichamen en polyklonale sera gericht tegen gp340 neutraliseren EBV in

vitro (165). De cottontop tamarinds, het enige, gevoelige dier, kan worden beschermd door een immunisatie met gezuiverd gp340 (166) en met een recombinant EBV gp340 vaccinia virus (167). In dit geval werd de bescherming verkregen met
5 een recombinant afgeleid van de WR vaccinia stam, doch niet met een recombinant afgeleid van de Wyeth vaccinia stam. De Wyeth stam wordt op grote schaal toegepast als een vaccin-stam.

Monoklonale antilichamen gericht tegen gp85, het
10 EBV homoloog van HSV1 gH, zijn beschreven als in vitro neutraliserende antilichamen (168,169).

Humaan-cytomegalovirus (HCMV) is een lid van de β -herpesvirinae subfamilie (familie Herpesviridae). HCMV kan een aanhoudende, produktieve infectie tegenover substantiële specifieke immuniteit produceren. Zelfs indien HCMV een
15 lage pathogeniciteit in het algemeen bezit, veroorzaakt intrauteriene infectie hersenbeschadigingen of doofheid bij ongeveer 0,15 % van alle pasgeborenen en het is de meest voorkomende infectieuze complicatie van orgaantransplantatie (170). Hoewel de doeltreffendheid van een experimenteel, levend, verzwakt (Towne stam) HCMV vaccin is gedemonstreerd (171), hebben bezorgdheid betreffende levende
20 vaccinstammen tot pogingen geleid om de identificatie van HCMV eiwitten die bruikbaar zijn als een sub-eenheidsvac-cins te identificeren. In dit opzicht is de identificatie van virion glycoproteïnen en hun beoordeling als beschermende middelen een belangrijke stap.

Er zijn drie immunologisch bepaalde families van glycoproteïnen geassocieerd met de HCMV envelop beschreven
30 (172): gCI (gp55 en gp93-130); gCII (gp47-52); en gCIII (gp85-p145).

Het gen coderende voor gCI is homoloog aan HSV1 gB. De gCII glycoproteïnen worden gecodeerd door een familie van vijf genen (HXLF), gerangschikt in een tandem
35 en delende één of twee homologiegebieden. Waarschijnlijker wordt gCII slechts door twee van deze genen gecodeerd (172,173). Het gen coderende voor gCIII is homoloog aan

HSV1 GH (174).

In vitro neutraliserende antilichamen die specifiek gericht zijn tegen elk van deze families zijn beschreven (174-176).

- 5 Geschiedt gemodificeerde pokkenvirusmutanten die exogene paard herpesvirus genen bevatten die tot expressie zijn gebracht in een gastheer als een antigene determinant die de produktie door de gastheer van antilichamen tegen herpesvirus antigenen opwekt, vormen nieuwe vaccins die de
10 nadelen van gebruikelijke vaccins, onder toepassing van gedode of verzwakte levende organismen, missen. Zo vereist bijvoorbeeld de bereiding van vaccins uit gedode organismen de groei van grote hoeveelheden van de organismen, gevolgd door een behandeling die selectief hun infectievermogen zal
15 doden zonder hun antigeniciteit aan te tasten. Aan de andere kant hebben vaccins die verzwakte, levende organismen bevatten altijd de mogelijkheid van een omkering van het verzwakte organisme in een pathogene toestand. Indien daarentegen een recombinant pokkenvirus dat geschikt
20 gemodificeerd is met een paard herpesvirus gen coderende voor een antigene determinant van een ziekte teweeg bringende herpesvirus als vaccin wordt toegepast, wordt de mogelijkheid van reversie in een pathogeen organisme vermeden, aangezien het pokkenvirus slechts het gen coderende voor de antigene determinant van het ziekte teweeg
25 bringende organisme en niet die genetische gedeelten van het organisme dat verantwoordelijk is voor de replicatie van het pathogeen, bevat.

- PRV infecteert fataal vele zoogdierspecies (rund-
30 vee, honden enz.). Volwassen varkens overleven echter gewoonlijk de infectie en vormen daardoor een belangrijk virusreservoir. Omdat PRV ernstige economische verliezen veroorzaakt, wordt in vele landen vaccinatie van varkens met verzwakte of gedode vaccins uitgevoerd.

- 35 Pogingen PRV infectie in varkens te bestrijden en economische verliezen te verminderen werden uitgevoerd door actieve immunisatie met gemodificeerde, levende of geïnac-

- tiveerde vaccins. Verzwakte vaccins die in het algemeen een langdurende immuniteit induceren en wat kosten betreft doeltreffend zijn houden echter het risico van een onvolgende verzwakking of genetische instabiliteit in. Geïnactiveerde vaccins zijn minder doeltreffend, vereisen vele immunisaties en bevatten gewoonlijk krachtige adjuvantia. Deze laatste preparaten kunnen na het vaccineren allergische reacties induceren, zoals gebrek aan eetlust, hyperthermie of miskramen bij drachtige zeugen. Deze vaccintypen lijden eveneens aan bepaalde nadelen wat betreft het voorkomen van latente infecties, overwinnen van de effecten van maternale antilichamen of de doeltreffendheid van de vaccinatie en elimineren het potentiële gebruik van een serologisch diagnostisch onderzoek ter onderscheiding van gevaccineerde dieren van die welke vooraf met PRV zijn geïnjecteerd.

- Alternatieve vaccinatiestrategieën, zoals het gebruik van recombinant pokkenvirussen die immunologisch belangrijke PRV genprodukten tot expressie brengen zullen bepaalde voordelen bezitten: (a) elimineren levende, verzwakte PRV vaccinstammen uit het gebied en (b) maken het onderscheid tussen gevaccineerde en geïnfecteerde of seropositieve dieren mogelijk. Dit laatste zal geschieden door toepassing van geschikte, diagnostische reagentia die nauwkeurig gevaccineerde van natuurlijk geïnfecteerde dieren onderscheiden. Dit is een belangrijke overweging gezien de bestaande voorschriften die het vervoer van seropositieve dieren regelen. Verder is de vaccinatie economischer en verdient aanbeveling wat het onderzoek en elimineren van geïnfecteerde dieren uit de groepen betreft. Het ontwikkelen van dergelijke vaccins vereist een kennis van de bijdragen die door geschikte PRV antigenen aan de inductie van beschermende immuniteit wordt geleverd. In het geval van PRV, evenals bij andere leden van de herpesvirusfamilie, zijn de glycoproteïnen belangrijke kandidaten voor antigenen die in een doeltreffend sub-eenheid recombinant vaccin aanwezig zijn.

De technologie van het ontwikkelen van vaccinia virus recombinanten is onlangs uitgebreid met andere leden van de pokkenvirusfamilie die een beperkter gastheergebied hebben. In het bijzonder vogelpokkenvirussen, die zich
5 vermeerderen in vogelspecies, zijn geconstrueerd teneinde immunologische, van belangzijnde genprodukten tot expressie te brengen. Inenting van vogel (42,177) en niet-vogel species (41) met vogelpokkenvirusrecombinanten wekken beschermende immuunresponsen tegen het overeenkomstige
10 pathogeen op.

Verzwakte levende vaccins en geïnactiveerde vaccins voor BHV1 zijn meer dan 30 jaar beschikbaar en hebben met succes het voorkomen van met BHV1 verwante ziekten verminderd. Deze vaccins verhinderen echter niet
15 latente infectie of herinfectie met wildtype virus. Ze bemoeilijken eveneens de differentiatie tussen geïnfecteerde en gevaccineerde dieren.

Beide typen vaccins hebben andere belangrijke nadelen. De vaccinatie van zwangere koeien met verzwakte,
20 levende vaccins kunnen de dood van het foetus en daarna een miskraam veroorzaken (127). Bovendien bleken gevaccineerde dieren het virus te verspreiden (178). Daarom kunnen gevaccineerde dieren die met zwangere koeien tezamen worden gehouden infectueus virus naar het zwangere dier versprei-
25 den en een miskraam van de foetus veroorzaken.

Geïnactiveerde vaccins induceren geen miskramen en veroorzaken geen virale excretie. Ze maken echter het gebruik van adjuvantia nodig en kunnen fatale hypersensibiliteitsreacties (anafylaxis) en niet-fatale ontstekingen en
30 koorts (179) veroorzaken.

Eén van de belangrijkste aspecten van de vaccinatie is het overwinnen of vermijden van de moederimmunitet. In dit opzicht wordt opgemerkt dat indien een moeder immuun is voor een speciale pathogeen, de "immunitet" in de
35 moeder via de antilichamen die in het colostrum aanwezig zijn en/of via andere wegen zal overgaan op de pasgeborene. Desalniettemin kan de pasgeborene niet met succes worden

gevaccineerd totdat de mate van moederimmunitet voldoende is verminderd. Er is daarom een nauw gebied waarin de pasgeborene met succes kan worden gevaccineerd in aanwezigheid van afnemende moederimmunitet.

- 5 Het zal dus duidelijk zijn dat het verschaffen van een herpesvirusrecombinant pokkenvirus en van vaccins die een beschermende immunitet tegen herpesvirusinfecties verlenen, die de stand der techniek de voordelen van inënting met levend virus bieden, doch de hiervoor besproken moeilijkheden verminderen of wegnemen, een zeer gewenst voordeel boven de gangbare stand van de techniek zullen bieden.
- 10

Doelstellingen van de uitvinding.

- 15 Daarom is een doel van deze uitvinding het verschaffen van recombinant pokkenvirussen, welke virussen genprodukten van het herpesvirus tot expressie brengen en het verschaffen van een methode voor het bereiden van dergelijke recombinant pokkenvirussen.
- 20

Een ander doel van deze uitvinding is het kloneren en tot expressie brengen van herpes virus coderende volgor-den in een pokkenvirusvector, in het bijzonder een vaccinia virus, pluimveepokkenvirus of kanariepokkenvirusvector.

- 25 Weer een ander aspect van deze uitvinding is het verschaffen van een vaccin dat in staat is herpesvirus neutraliserende antilichamen op te wekken en een beschermende immunitet tegen letale herpesvirusprovocatie te geven.

- 30 Deze en andere doelstellingen en voordelen van de onderhavige uitvinding zullen duidelijker worden na kennisneming van het volgende.

Verklaring van de uitvinding.

- 35 Een aspect van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een recombinant pokkenvirus dat daarin een

9900034

DNA volgorde van herpesvirus in een niet-essentieel gebied van het pokkenvirusgenoom bevat. Het is gunstig indien het herpesvirus een lid van de α -herpesvirus, β -herpesvirus of γ -herpesvirus onderfamilie is. In het bijzonder codeert de

5 DNA volgorde uit herpesvirus voor een herpesvirus glycoproteïne. Meer in het bijzonder wordt het herpesvirus glycoproteïne gekozen uit de groep bestaande uit paard herpesvirus gp13, paard herpesvirus gp14, paard herpesvirus gD, paard herpesvirus gp63, paard herpesvirus gE, pseudorabies virus gp 50, pseudorabies virus gpII, pseudorabies virus gpIII, pseudorabies virus gpI, herpes simplex virus gB, herpes simplex virus gC, herpes simplex virus gD, runder herpes virus gI, kat herpes virus gB, Epstein-Barr virus gp220, Epstein-Barr virus gp340, Epstein-Barr virus gB,

10 Epstein-Barr virus gH en humaan cytomegalovirus gB.

Volgens de onderhavige uitvinding brengt het recombinant pokkenvirus genprodukten van het vreemde herpesvirusgen tot expressie. In het bijzonder codeert de vreemde DNA volgorde voor een herpesvirus glycoproteïne en

20 wordt het vreemde DNA in een gastheer tot expressie gebracht door de vorming van een herpesvirus glycoproteïne. Het is gunstig indien een aantal herpesvirus glycoproteïnen samen in de gastheer door de recombinant pokkenvirus tot expressie wordt gebracht. Het pokkenvirus is geschikt een

25 vaccinia virus of een vogelpokkenvirus, zoals een pluimveepokkenvirus of kanariepokkenvirus.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een vaccin voor het induceren van een immunologische respons in een gastheerdier dat met het

30 vaccin is ingeënt, welk vaccin een drager en een recombinant pokkenvirus, bevattende, in een niet-essentieel gebied daarvan, DNA van herpesvirus, bevat. Meer in het bijzonder codeert het DNA voor en brengt tot expressie een herpesvirus glycoproteïne. Geschikt wordt een aantal herpesvirus

35 glycoproteïnen samen in de gastheer door het pokkenvirus tot expressie gebracht. Het pokkenvirus dat in het vaccin volgens de onderhavige uitvinding wordt toegepast is

geschikt een vaccinia virus of een vogelpokkenvirus, zoals gevogeltepokkenvirus of kanariepokkenvirus.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op mechanismen om het aspect van de moederimmunitet te mijden. Indien de belemmering is toe te schrijven aan de aanwezigheid van antilichamen voor een bepaald antigeen(en), dan kan de barrière van de moederimmunitet worden overwonnen of vermeden door, selectief, gebruik te maken van vectoren die bepaalde ondergroepen van antigenen tot expressie brengen. Zo kan bijvoorbeeld het zwangere dier worden gevaccineerd met een recombinant vaccinia virus dat pseudorabies virus glycoproteïne gp50 tot expressie brengt en het nakomelingschap kan bij de geboorte of kort daarna worden gevaccineerd met vaccinia recombinanten die andere pseudorabies virus glycoproteïnen gpII of gpIII of combinaties daarvan, tot expressie brengen. Indien aan de andere kant de barrière van de moederimmunitet is toe te schrijven aan de vector, kan men verschillend de moeder met één vector (vaccinia of vogelpokken) en het nakomelingschap met de andere vector vaccineren. Deze procedure houdt natuurlijk niet alleen het gebruik van verschillende vectoren in, doch eveneens van factoren die een verschillende constellatie van glycoproteïnen tot expressie brengen. De onderhavige uitvinding heeft dus betrekking op een methode voor het overwinnen of vermijden van moederimmunitet, welke anders een succesvolle immunisatie bij pasgeborenen zal verhinderen. Volgens de onderhavige uitvinding wordt de nakomenschap van pasgeborenen ingeënt met een recombinant pokkenvirus dat daarin DNA van een niet-pokkenvirusbron in een niet-essentieel gebied van het pokkenvirusgenoom bevat, welk DNA codeert voor een eerste antigeen van een pathogeen van de nakomelingschap van pasgeborenen en welk antigeen verschilt van een tweede antigeen van hetzelfde pathogeen dat wordt toegepast voor het induceren van een immunologische respons op hetzelfde pathogeen in de moeder van de nakomelingschap van pasgeborenen. Eveneens wordt volgens de onderhavige uitvinding de

nakomelingschap van pasgeborenen ingeënt met een recombi-
nant eerste pokkenvirus dat daarin DNA van een niet-pokken-
bron in een niet-essentieel gebied van het eerste pokkenvi-
rusgenoom bevat, welk DNA codeert voor een antigeen van een
5 pathogeen van de nakomelingschap van pasgeborenen en welk
eerste pokkenvirus verschilt van een recombinant tweede
pokkenvirus dat gebruikt wordt voor het induceren van een
immunologische respons op hetzelfde pathogeen in de moeder
van de nakomelingschap van pasgeborenen.

10

Korte beschrijving van de tekeningen.

Er zal een beter begrip van de onderhavige uitvin-
ding worden verkregen door verwijzing naar de bijgesloten
15 tekeningen, waarin

Figuur 1 schematisch een methode voor de construc-
tie van het recombinant vaccinia virus vP425 geeft,

Figuur 2 de DNA volgorde van een EHV-1 1,88 Kb
fragment bevattende de gp13 coderende volgorden laat zien,

20 Figuur 3 schematisch een methode voor de con-
structie van het recombinant vaccinia virus vP483 bevat-
tende het EHV-1 gp13 gen afbeeldt,

Figuur 4 schematisch een methode voor de construc-
tie van het recombinant vaccinia virus vP458 afbeeldt,

25 Figuur 5 schematisch een methode voor de construc-
tie van het recombinant vaccinia virus vP577 bevattende het
EHV-1 gp14 gen geeft,

Figuur 6 de DNA volgorde van een EHV-1 3,35 Kb
fragment bevattende de gp14 coderende volgorde vertoont,

30 Figuur 7 een grafiek van de relatieve hydrofieli-
citeit voor de EHV-1 gp14 coderende volgorden is,

Figuur 8 schematisch een methode voor de construc-
tie van het recombinant gevogelte pokkenvirus vFP44 bevat-
tende het EHV-1 gp13 gen vertoont,

35 Figuur 9 schematisch een methode voor de construc-
tie van het recombinant kanariepokkenvirus vCP48 bevattende
het EHV-1 gp13 gen geeft,

Figuur 10 schematisch een methode voor de constructie van de donorplasmiden pHES-MP63, pHES-MP1 en pHES-MP34, bevattende gemodificeerde versies van het EHV-1 gp14 gen, vertoont,

- 5 Figuur 11 een kaart van de BamHI splitsingsplaat-
sen van de EHV-1 Kentucky D stam geeft, aanduidende de
omgekeerde herhalingen van het genoom door rechthoeken,
aantonende de plaats van de zes hoofd EHV-1 glycoproteïne-
genen en vertonende een uitbreiding van het gebied van het
10 genoom dat de gD, gp63 en gE genen bevat,

Figuur 12 de nucleotidevolgorde van een EHV-1 6402
basepaarfragment bevattende de gD, gp63 en gE coderende
volgorden vertoont,

- 15 Figuur 13 een hydropathie grafiek van de volgorde
van 402 aminozuren samen vormende EHV-1 gD is,

Figuur 14 een hydropathie grafiek van de volgorde
van 413 aminozuren, samen vormende EHV-1 gp63 is,

Figuur 15 een hydropathie grafiek van de volgorde
van 552 aminozuren, samen vormende EHV-1 gE is,

- 20 Figuur 16 schematisch een methode voor de con-
structie van donorplasmiden pJCA006, pJCA007 en pJCA008
bevattende respectievelijk het EHV-1 gD gen, het EHV-1 gE
gen en het EHV-1 gp63 gen, en ontwikkeling van recombinant
vaccinia virus bevattende deze genen vertoont,

- 25 Figuur 17 schematisch een methode voor de con-
structie van de donorplasmiden pJCA009 (bevattende de EHV-1
gD en gp63 genen) en pJCA010 (bevattende het EHV-1 gD, gp63
en gE genen) en ontwikkeling van recombinant vaccinia virus
bevattende deze genen vertoont,

- 30 Figuur 18 schematisch een methode voor de con-
structie van donorplasmide PR18 bevattende het PRV gpII gen
en vorming van recombinant vaccinia virus dat het PRV gpII
gen tot expressie brengt, geeft,

- 35 Figuur 19 de DNA volgorde van het PRV gpII open
afleesframe geeft,

Figuur 20 schematisch een methode voor de con-
structie van donorplasmide pPR24 bevattende het PRV gpIII

gen en vorming van recombinant vaccinia virus uitdrukken-
de het PRV gpIII gen vertoont,

Figuur 21 de DNA volgorde van het PRV gpIII open
afleesframe aangeeft,

5 Figuur 22 schematisch een methode voor de con-
structie van het donorplasmide pPR26 bevattende het PRV
gp50 gen en vorming van recombinant vaccinia virus dat het
PRV gp50 gen tot expressie brengt, geeft,

10 Figuur 23 de DNA volgorde van het PRV gp50 open
afleesframe vertoont,

Figuur 24 schematisch een methode voor de con-
structie van de plasmiden pSD478VC en pSD479VCBG en invoeg-
ing van β -galactoside in vaccinia virus afbeeldt,

15 Figuur 25 schematisch een methode voor de con-
structie van plasmide pMP13PP vertoont,

Figuur 26 schematisch een methode voor de con-
structie van het plasmide pFPPRVII, bevattende het PRV gpII
gen, weergeeft,

20 Figuur 27 schematisch een methode voor de con-
structie van het recombinant kanariepokkenvirus vCP55, tot
expressie brengend het PRV gpII gen, weergeeft,

Figuur 28 schematisch een methode voor de con-
structie van de recombinant vaccinia virus vP717, tot
expressie brengend het PRV gI gen, geeft,

25 Figuur 29 schematisch een methode voor de con-
structie van de recombinant vaccinia virussen vP569 en
vP734, tot expressie brengen het HSV-2 gB gen, geeft,

Figuur 30 schematisch een methode voor de con-
structie van de recombinant vaccinia virussen vP579, vP748
30 en vP776, tot expressie brengend het HSV-2 gC gen, ver-
toont,

Figuur 31 schematisch een methode voor de con-
structie van de recombinant vaccinia virussen vP570, vP761,
vP775 en vP777, tot expressie brengend het HSV-2 gD gen,
35 weergeeft,

Figuur 32 schematisch een methode voor de con-
structie van de recombinant vaccinia virussen vP637 en

vP724, tot expressie brengend het BHV-1 gen, weergeeft,

Figuur 33 schematisch een methode voor de constructie van het donorplasmide pJCA001 bevattende het FHV-1 gB gen en voor de constructie van het recombinant vaccinia virus vP713, tot expressie brengend het FHV-1 gB gen, weergeeft,

Figuur 34 de nucleotidevolgorde van het 3400 bp segment van FHV-1 DNA coderende glycoproteïne gB afbeeldt,

Figuur 35 een hydropathie grafiek van de volgorde van 947 aminozuren vormende FHV-1 gB afbeeldt,

Figuur 36 schematisch een methode voor de constructie van de donorplasmiden 409gp220 bevattende het EBV gp220 gen en 409gp340, bevattende het EBV gp340 gen, weergeeft,

Figuur 37 schematisch een methode voor de constructie van het vaccinia donorplasmide 409gB, bevattende het EBV gB gen, weergeeft,

Figuur 38 schematisch een methode voor de constructie van het vaccinia donorplasmide 486gH bevattende het EBV gH gen weergeeft,

Figuur 39 schematisch de structuur van het vaccinia donorplasmide 513gHgBgp340, bevattende de EBV genen gp340, gB en gH voorstelt,

Figuur 40 schematisch een methode voor de constructie van het vaccinia donorplasmide 409CMVgB bevattende het CMV gB gen geeft,

Figuur 41 de nucleotide en aminozuurvolgorden van HCMV (Towne stam) HXLFl gen weergeeft, en

Figuur 42 de nucleotide en aminozuurvolgorden van HCMV (Towne stam) HXLf2 gen voorstelt.

Uitvoerige beschrijving van de uitvinding.

Een beter begrip van de onderhavige uitvinding en van de vele voordelen ervan kan nu worden ontleend aan de volgende voorbeelden die ter illustratie worden gegeven.

9900034

Voorbeeld 1:

Construëcie van vaccinia virus recombinanten die het paard herpesvirus gp13 glycoproteïne tot expressie brengen.

5 Vervanging van het HA gen van vaccinia door het
 E.coli β -galactosidasegen.

 In dit voorbeeld werd de Kopenhagenstam van het
vaccinia virus verkregen van Rhone Merieux, Inc. (Athens,
Georgia) gebruikt. Het virus werd gekweekt uit een gezu-
10 verd plaque isolatieprodukt op hetzij VERO (ATCC# CCL81) of
MRC-5 (ATCC# CCL171) cellen in Eagle's minimaal essentieel
medium (MEM) plus 10 % foetaal runderserum (FBS). Een
derivaat van het wildtype virus waaruit volgens standaard-
methoden (25,28) de volledige coderingsvolgorde voor het
15 thymidinekinasegen was deleted werd geïsoleerd en aangeduid
met VP410. Deze thymidinekinasedeletiemutant werd toegepast
voor verdere behandelingen. Plasmiden werden geconstrueerd,
onderzocht en deze liet men volgens standaardmethoden
groeien (20,27,28).

20 Onder verwijzing nu naar figuur 1, werd het 13 Kb
SalI fragment van het vaccinia virus dat de HindIII A/B
fragmentverbinding omspant gebonden aan SalI gedigereerd
pUC8 ontwikkelend pSD419VC. De rechterarm van pSD419VC
overeenkomende met het HindIII B gedeelte van het SalI
25 fragment werd verwijderd door digeren met HindIII en weer
gebonden onder vorming van pSD456VC. pSD456VC bevat dus het
rechter uiteinde van het HindIII A fragment, waarin het
volledige, coderende gedeelte voor het hemagglutinine (HA)
gen (35) geflankeerd door ongeveer 0,4 Kb extra vaccinia-
30 volgorden aan elke kant aanwezig is.

 Ter verkrijging van een plasmidevector die vrijwel
zonder HA coderende volgorden is, werd pSD456VC geknipt
(gedeeltelijk gedigereerd) bij de RsaI plaats stroomop-
waarts van het HA gen en bij de EagI plaats 80 bp van het
35 3' einde van het HA gen. Het benaderde 3,5 Kb RsaI/EagI
fragment werd uit een agarosegel geïsoleerd.

 Synthetische oligonucleotiden MPSYN59-62 werden

9900034

bereid ter vervanging van het gebied van de RsaI plaats tot plaats 2 stroomopwaarts van de HA coderende volgorde, onmiddellijk gevolgd door de BglII, SmaI en PstI restrictieplaatsen en een EagI sticky uiteinde. De volgorde van
 5 MPSYN59-62 met de aangegeven restrictieplaatsen is als volgt:
 5'-ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTATAGGTAGTTGATAGAACAA
 3'-TGTGCTTACTAAAAGATTTCATAAACCTTCAAAATATCCATCAACTATCTTGTT

10 AATACATAATTTTGTAAAAATAATCACTTTTTATACTAAGATCTCCCGGGC-
 TGCAGC-3'
 TTATGTATTAAAAACATTTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTA-
GAGGGCCCGACGTCGCCGG-5'
BglII SmaI PstI EagI

15

Het annealed MPSYN59-62 mengsel werd gebonden aan het 3,5 Kb RsaI/EagI fragment van PSD456VC, onder vorming van PSD466VC. Zo is dus in PSD466VC het HA gen vervangen door een polylinkergebied.

20

Een 3,2 Kb BglII/BamHI (partieel) fragment bevat-
 tende het E.coli β -galactosidase gen van pMC1871 (34) onder de transcriptionele controle van de vaccinia 11 kDa promotor (7) werd gekloneerd in PSD466VC, dat was gedigereerd met BglII. Een plasmide dat de 11 kDa promotor/ β -galactosidase gen cassette in een van links tot rechts oriëntatie ten opzichte van de flankerende vaccinia armen bevatte werd met PSD466VCBGA aangeduid en gerecombineerd in een thymidinekinasedeletiemutant, vP410, van de Kopenhagenstam van het vaccinia virus onder vorming van de vaccinia recombinant
 25 vP425 tot expressie brengend het β -galactosidase. 80 baseparen bij het carboxyluiteinde van het HA gen werden behouden, teneinde niet een korte, potentiële open afleesframe overgeschreven van rechts naar links ten opzichte van het vacciniagenoom te verbreken.

30

Het recombinant vaccinia virus, vP425 (184) werd geïdentificeerd op basis van blauwe plaquevorming in aanwezigheid van het chromogene substraat, X-gal, zoals

door anderen is beschreven (9,24). Vervanging van het β -galactosidasegen door nog een ander vreemd gen in opeenvolgende vaccinia recombinanten kon gemakkelijk worden gevolgd door isolatie van kleurloze plaques in plaats van blauwe plaques.

Ter vergemakkelijking van toekomstige kloningsstappen, werd de SmaI-plaats afgeleid van het pUC8 multi-klonerend gebied geëlimineerd door digeren van pSD466VC met BamHI/EcoRI, blunt eindigende met het Klenow-fragment van E.coli polymerase en weer verknoping. Zo is dus de enkelvoudige SmaI plaats die achterblijft in het verkregen plasmide, pSD467VC, in het polylinkergebied van de HA deletie aanwezig.

Identificatie van DNA volgorden coderende het EHV-1 gp13 gen.

De DNA volgorde coderende voor het glycoproteïne EHV-1 gp13 is aanwezig in het 7,3 Kb BamHI-H fragment van EHV-1 (3). De nucleotidevolgordewaarden voor beide strengen werd verkregen uit het pUC (BamHI-H) gebied, onder toepassing van overlappende sub-klonen onder toepassing van het gemodificeerde T7 enzym SEQUENASE (40) (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH). Standaard didesoxy ketenbeëindigende reacties (33) werden uitgevoerd op dubbelstrengs plasmidematrijzen die waren gedenatureerd in een alkali. De M13 voorwaartse en omgekeerde primers werden toegepast ter verkrijging van de aanvankelijke volgorde van elke kloon. Custom 16-17-mer primers, gesynthetiseerd onder toepassing van standaardchemie (Biosearch 8700, San Rafael, CA; Applied Biosystems 380B, Foster City, CA) werden toegepast bij het gaan langs het overblijvende fragment. Het IBI Pustell volgorde-analyseprogramma werd bij alle analyses ter bepaling van de volgorde toegepast (29).

DNA sequence analyses gaven een open afleesframe van 1.404 bp coderende voor 468 aminozuren met een voorspeld primair translatieproduct van 50,9 kDa. Een significante aminozuurhomologie in de carboxylhelft van het

vermeende gp13 open afleesframe werd waargenomen bij gC van de herpes simplex virussen type 1 en type 2, gIII van het pseudorabies virus en gpV van het varicella-zoster virus, suggererende dat gp13 een lid was van de gC achtige glycoproteïnen van herpesvirussen. Een verdere uitvoerige analyse van het EHV-1 gp13 open afleesframe werd aangeboden in een voorgaande publikatie (2). Ter vergemakkelijk van de beschrijving van het klonen en de expressie van het EHV-1 gp13 in vaccinia virus vectoren zijn het gp13 open afleesframe plus extra 5' en 3' volgorden weergegeven in figuur 2. In figuur 2 zijn een vermoedelijke TATA box en aminozuren die vermeende signalen en membraananker-elementen bevatten onderstreept. De potentiële splitsingsplaats van de signaalvolgorde is aangegeven met een pijl die het splitsingssignaal ASA (open cirkels) volgt. Potentieel zijn er negen N-verbonden glycosyleringsplaatsen in de signaalen ankerfolgorden, zoals is gedefinieerd door het Asn-X-Ser/Thr motief (sterretjes).

20 Klonering van het EHV-1 gp13 gen in een vaccinia virus donorplasmide.

Een vroeg-laag vaccinia viruspromotor, H6, werd toegepast voor de expressie van vreemde genen in pluimveepokkenvirusvectoren (41, 42). Dit promotorelement correspondeert met de DNA volgorden onmiddellijk stroomopwaarts van het H6 open afleesframe in het vaccinia HindIII-H fragment (31).

Onder verwijzing nu naar figuur 3, werden ter mutering en invoeging van het H6 promotor in pSD467VC oligonucleotiden H6SYN oligos A-D gesynthetiseerd. De volgorde van H6SYN oligos A-D, met gemodificeerde base zoals is onderstreept en restrictieplaatsen zoals is aangegeven, is als volgt:

BglII

35 5'-GATCTCTTTATTTCTATACTTAAAAAGTAAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTT
3' -AGAAATAAGATATGAATTTTCACTTTTATTATGTTTCCAAGAACTCCCAA

GTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTTAA
CACAAATTTAACTTTTCGCTCTTTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAATT

GTTTGTATCGTACCC-3'

5 CAAACATAGCATGGG-5'

SmaI

De onderstreepte basen duiden op modificatie van de natieve H6 promotorvolgorde.

Het 130 bp volle lengte, dubbelstrengs DNA gevormd door annealing van H6SYN oligos A-D werd gezuiverd door elektroelutie uit een agarosegel en verbonden met 0,5 Kb SmaI/HindIII en 3,1 Kb BglII/HindIII fragmenten afgeleid van pSD467VC. Het verkregen plasmide, pTP15 (184), heeft de ATG initiatiecodon gemodificeerd tot CCC als deel van de SmaI plaats, die onmiddellijk wordt gevolgd door een PstI plaats. Een NsiI linker, 5'-TGCATGCATGCA-3', (New England Biolabs, Beverly, MA) werd ingevoegd op de SmaI plaats van pTP15 ter vorming van het plasmide pNSI.

Een EHV-1 EcoRI/NarI fragment waarin de EcoRI plaats is 120 bp stroomopwaarts van de ATG initiatie codon en waarin de NarI plaats is 23 bp stroomopwaarts van het TAG terminatie codon van EHV-1 gp13 werd gekloneerd in faag M13EcoRNar. Onder toepassing van oligonucleotide-gerichte mutagenese (17) werd een NsiI plaats geïntroduceerd door verandering van de volgorde TTGCCT (basen 130-135 in figuur 2) in het EHV-1 gp13 gen in ATGCAT. Het EcoRI/NarI fragment uit mutantfaag M13EcoRNar werd gekloneerd in pUC8 bij de EcoRI/NarI plaatsen onder vorming van het plasmide pNSIEN.

Twee 42-mer oligonucleotiden werden gesynthetiseerd met de volgende, met de aangeduide restrictieplaat-sen, volgorde:

NarI gp13 3' einde

NdeI

5'-CGCCGTACAAGAAGTCTGACTTTTAGATTTTATCTGCAGCA-3'

35 3' -GGCATGTTCTTCAGACTGAAATCTAAAAATAGACGTCGTAT-5'

PstI

9900034

In dit oligonucleotide, wordt de terminatiecodon (TAG) onmiddellijk gevolgd door een vaccinia vroege transcriptie terminator (ATTTTAT). Het dubbelstrengs DNA fragment verkregen door annealing het paar van 42-mers
5 bevat een NarI sticky uiteinde, gevolgd door het 3' uiteinde van de coderende volgorde voor het EHV-1 gp13 gen, evenals een vaccinia vroeg transcriptie terminatiesignaal (45), een PstI plaats en een NdeI sticky uiteinde. Dit fragment werd ingevoegd tussen de NarI/NdeI plaatsen van
10 pNSIEN dat pNSIENPN vormt (fig. 3).

Het NsiI/PstI fragment uit pNSIENPN werd geïsoleerd en gekloneerd in de NsiI/PstI plaatsen van het plasmide pNSI, onder vorming van het plasmide pVHA6g13NsiI (fig. 3). pVHA6g13NsiI werd geknipt op de EcoRI plaats in
15 de H6 promotor en de NsiI plaats die was ingevoerd bij het begin van het EHV-1 gp13 gen. Dit vectorfragment werd blunt ended met Mung Bean nuclease. De complementaire 32-mer oligonucleotiden werden gesynthetiseerd met de volgende volgorde, met de aangegeven restrictieplaats:

20

EcoRV

5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTGGTTGCC-3'

3'-TAGGCAATTCAAACATAGCATTACACCAACGG-5'

H6 promotor gp13 5' einde

25

Deze oligonucleotiden werden annealed en gebonden in het pVHA6g13NsiI vectorfragment, onder vorming van het plasmide pVHA6g13, dat een nauwkeurige verbinding bij het ATG initiëeringscodon (onderstreept in de 32-mer volgorde)
30 van de H6 promotor en EHV-1 gp13 gen (fig. 3) bevat.

pVHA6g13 werd door transfectie gebracht in met vP425 geïnfecteerde cellen ter vorming van het vaccinia recombinant vP483, dat het EHV-1 gp13 gen (fig. 3) bevat.

35

Constructie van vaccinia virus recombinanten.

Werkwijzen voor transfectie van recombinant

9900034

- donorplasmiden in weefselcultuurcellen geïnfecteerd met een gered vaccinia virus en identificatie van recombinanten door in situ hybridisatie op nitrocellulosefilters werd op een hiervoor beschreven wijze uitgevoerd (25,28). Ter
- 5 constructie van vP425 waarin het E.coli β -galactosidase gen de vaccinia HA coderingsvolgorden vervangt, werd het plasmide DNA (25 μ g pSD466VCBGA in HeBS (16)) geëlektroporeerd (Biorad Gene Pulser, capaciteit 960, 200 volt) in VERO cellen. Subconfluent monolagen van cellen werden 1 uur
- 10 voor het gebruik geïnfecteerd tot 10 pfu/cel met vP410. De geïnfecteerde cellen werden gewonnen met trypsine en voor de elektroporatie gewassen met HeBS. De cellen werden 24 uur geïncubeerd in MEM + 5 % foetaal runderserum bij 37°C, gewonnen en progeny virus plated op VERO monolagen. Recombinant virus β -galactosidase tot expressie brengend werd
- 15 gedetecteerd als blauwe plaques in aanwezigheid van X-gal substraat (9,24). Ter vorming van recombinant vaccinia virus waarin het EHV-1 gp13 het β -galactosidase gen in vP425 vervangt, werd een overeenkomstig protocol gevolgd, behalve dat het donorplasmide pVHA6g13 en het reddende
- 20 virus vP425 was. De vaccinia recombinant vP483, bevattende EHV-1 gp13, werd gedetecteerd als een kleurloze plaque in aanwezigheid van X-gal en bevestigd als een echte recombinant door DNA-hybridisatie na 3 cycli van plaquezuivering.
- 25

Expressie van het EHV-1 gp13 gen op het oppervlak van cellen geïnfecteerd met het recombinant vaccinia virus vP483.

- BSC-40 cellen werden geënt op glazen dekplaatjes
- 30 van 22 mm in schalen van 35 mm met 5×10^5 cellen/schaal. Bij ongeveer 80 % samenvloeiing werden de dieren geïnfecteerd met 2 pfu/cel. Na een adsorptieperiode van een uur werd de virusentstof verwijderd en werd MEM plus 2 % foetaal runderserum toegevoegd. 20 Uur na infecteren werden
- 35 de dekplaatjes gewassen met een met fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) die 0,2 % BSA en 0,1 % NaN₃ (PBS+) bevatte en blootgesteld aan 0,1 ml anti-gp13 monoklonaal

antilichaam, 14H7 (3) verdund tot een duizendste in PBS+. Na 1 uur in een bevochtigde kamer bij kamertemperatuur werden de cellen driemaal gewassen in PBS+. Deze procedure werd herhaald met fluoresceïne isothiocyanaat-geconjugeerd
5 geit anti-muis IgG. Tenslotte werden de cellen 20 minuten in 2 %-ige paraformaldehyde in PBS gefixeerd. De dekplaatjes werden gemonteerd in 80 % glycerol in PBS bevattende 3 % n-propylgallaat en de fluorescentie werd met behulp van een microscoop waargenomen.

10 Het eiwit voorspeld uit de DNA volgorde heeft de typische kenmerken die kenmerkend zijn voor een membraan overspannend glycoproteïne (14). Bij een produktieve EHV-1 infectie wordt dit gp13 glycoproteïne opgenomen in de
15 verschillende membraansystemen van de cel en wordt getransporteerd in het cytoplasmische membraan en kan op het uitwendige oppervlak van de geïnfecteerde cel worden aangetoond. EHV-1 gp13 is bovendien een bestanddeel van het EHV-1 virion. Daarom werden immunofluorescentieonderzoekingen
20 uitgevoerd ter bepaling of EHV-1 gp13 tot expressie gebracht door het vaccinia virus recombinant, vP483, eveneens op het cytoplasmische membraan van geïnfecteerde cellen aanwezig was. Anti-gp13 specifiek monoklonaal antilichaam gevolgd door fluoresceïne-geconjugeerd geit
25 anti-muis IgG gaf een sterke membraan immunofluorescentie in met vP483 geïnfecteerde cellen doch niet in met vaccinia virus vP410 geïnfecteerde cellen. Dit doet vermoeden dat het EHV-1 gp13 tot expressie gebracht door het recombinant vaccinia virus vP483 aanwezig is op het cytoplasmische
30 membraan, zoals verwacht werd voor de authentieke synthese van een membraan overspannend glycoproteïne.

Immunoprecipitatie van EHV-1 gp13 produkten
gesynthetiseerd uit met recombinant vaccinia virus vP483
geïnfecteerde cellen.

35 Twee miljoen cellen die een samenvloeiende monolaag in een schaal van 60 mm vormden werden geïnfecteerd met 10 pfu/cel. Het enten werd uitgevoerd in een medium dat

9900034

- geen methionine bevatte. Na de adsorptieperiode, werd de
entstof verwijderd en werd 2 ml geen methionine bevattend
medium bevattende $20 \mu \text{ Ci/ml}$ ^{35}S -methionine toegevoegd. Men
liet de infectie 24 uur verlopen waarna de cellen werden
5 gelyseerd door toevoeging van 1 ml van 3 x buffer A bevat-
tende 3 % NP-40, 30 mM Tris pH 7,4, 450 mM NaCl, 3 mM EDTA,
0,03 % natriumazide en 0,6 mg/ml PMSF. De gelyseerde cellen
en de bovenstaande vloeistof werden gewonnen, geroerd en
geklaard door 15 minuten te centrifugeren bij 10.000 g.
- 10 Proteïne A-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Cat. No.
17.0780.01) werd bereid als een 1:1 suspensie in 1X Buffer
A. Een rat anti-muis conjugaat (Boehringer Mannheim, Cat.
No. 605 500) werd verdund tot 1:100 in de suspensie en 4
uur bij kamertemperatuur onder schudden gebonden aan de
15 kralen. Daarna werden de kralen goed gewassen met 6 waspor-
ties van 1 ml in buffer A, ter verwijdering van het niet-
gebonden conjugaat. Een monoklonaal antilichaam specifiek
voor gp13 werd daarna gedurende 4 uur bij kamertemperatuur
aan de kralen gebonden. De overmaat antilichaam werd door
20 goed wassen verwijderd. 1 ml van het geklaarde, geïnfec-
teerde cellysaat werd van te voren geklaard door incubatie
met Proteïne A-Sepharose kralen waaraan normaal muizen-
serum was gebonden. Deze kralen werden door centrifugeren verwij-
derd. Daarna werd 1 ml van het geklaarde, voorgeklaarde
25 lysaat gemengd met $100 \mu \text{l}$ van de kralen waaraan het speci-
fieke, monoklonale antilichaam was gebonden. Dit mengsel
werd 4 uur bij kamertemperatuur geschud. Daarna werden de
kralen door centrifugeren verwijderd en innig gewassen door
viermaal wassen in 1X Buffer A en tweemaal wassen in 10 mM
30 Tris pH 7,4 bevattende 0,2 M LiCl en 2M ureum. Daarna werd
het antilichaam-antigeencomplex van de kralen verwijderd en
verbroken door toevoeging van $50 \mu \text{l}$ 2 x Laemmli Disrupting
Solution (60,195). Vervolgens werd het monster voor de
elektroforese 5 minuten gekookt.
- 35 Er zijn twee produkten van ongeveer 44 en 47 kDa
die kunnen worden aangetoond en die enigszins kleiner zijn
dan het voorspelde primaire translatieprodukt (51 kDa) en

een groter produkt van ongeveer 90 kDa dat overeenkomt met een volledig geglycosyleerde vorm van het EHV-1 gp13 genprodukt. Geen equivalente polypeptiden werden uit met controle, vaccinia virus geïnfecteerde cellen neergeslagen.

5

Voorbeeld 2

Constructie van vaccinia virus recombinanten die het paard herpesvirus gp14 glycoproteïne tot expressie brengen.

Vervanging van het M2L gen in vaccinia virus door
10 het E. coli β -galactosidase gen.

Teneinde de EHV-1 gp14 coderende volgorden in een vaccinia virusvector in te voegen, werd een recombinant vaccinia virus vP458, dat het E. coli LacZ gen tot expressie brengt, geconstrueerd. Substitutie van de LacZ coderende volgorden in het recombinantvirus, vP458, door de
15 volgorden die EHV-1 gp14 coderen, maakt een blauw tot kleurloos plaque onderzoeksysteem voor het identificeren van EHV-1 gp14 bevattende recombinantvirussen (9,24) in aanwezigheid van X-gal, een chromogeen β -galactosidasesubstraat, mogelijk. Bovendien werd, met de bedoeling van het
20 construeren van vaccinia virusrecombinanten die zowel EHV-1 gp14 als EH-1 gp13 tot expressie brengen, een invoegingsplaats voor EHV-1 gp14 uniek uit de hemagglutinine deleted plaats toegepast voor het invoegen van EHV-1 gp13 in
25 voorbeeld 1 bereid op de M2L plaats van HindIII M. De volledige coderende volgorde van het M2L gen in het vaccinia HindIII M fragment werd verwijderd en vervangen door het E. coli LacZ gen coderende β -galactosidase. De kloneringsstappen voor de constructie van vP458 zijn schematisch
30 weergegeven in figuur 4.

Onder verwijzing nu naar figuur 4 wordt opgemerkt, dat een open afleesframe lezende van rechts naar links ten opzichte van het vacciniagenoom en coderende voor een
vermeend eiwit van 220 aminozuren volledig binnen het
35 HindIII M fragment van de Kopenhagenstam van het vaccinia virus links van, de unieke BglII plaats is geplaatst. Volgens de conventie (31) werd dit gen, dat onmiddellijk

9900034

rechts van M1L (58) is geplaatst, met M2L aangeduid. Deletieonderzoekingen gericht op het vaccinia (WR) genoom dat zich links van de unieke BglII plaats in het HindIII fragment M (57) uitstrekt, geven aan dat met vaccinia coderende volgorden aanwezig in HindIII M links van de BglII plaats niet essentieel voor de replicatie van het virus in een weefselcultuur zijn.

Ter vergemakkelijking van de toepassing van het M2L gebied als invoegingsplaats voor vreemde genen, werd een plasmidevector, pMP409DVC, gevormd waarin de volledige M2L coderende volgorde op de volgende wijze was vervangen door een BglII plaats. pSD409VC, dat bestaat uit het Kopenhagen vaccinia HindIII M fragment gekloond op de HindIII plaats van pUC8, werd gedigereerd met BamHI/BglII en zelf gebonden, aldus verwijderend het rechter uiteinde van HindIII M en opheffing van de BglII plaats. Het verkregen plasmide, pMP409BVC werd lineair gemaakt met SphI, dat knipt in het M2L open afleesframe en werd 2 minuten onderworpen aan Bal-31 exonuclease digerering. Mutagenese werd uitgevoerd op het verkregen DNA (19) onder toepassing van een synthetisch 49 mer (5'-TTTCTGTATATTTGCAACAATTTAGATCTTACTCAAATATGTAAACAAT-3', BglII plaats onderstreept). In het gemutageniseerde plasmide pMP409DVC werden de M2L coderende volgorden uit plaats +3 tot het einde van het open afleesframe verwijderd. De G van het initiatiecodon ATG werd gewijzigd in een C ter vorming van een unieke BglII plaats (AGATCT) op het deletieknoppunt.

Een 3,2 Kb BglII/BamHI partieel fragment, bevattende 3,1 Kb van het E. coli β -galactosidase gen tussen de BamHI plaatsen van pMC1871 (34) onder de transcriptionale controle van de 0,1 Kb vaccinia 11 kDa late promotor (7) werd gekloneerd in de unieke BglII plaats van pMP409DVC. Een recombinantplasmide dat de 11 kDa promotor/ β -galactosidase gencassette in de rechter tot linker oriëntatie ten opzichte van flankerende vaccinia armen en genoom bevatte werd met pMP409DVCBG aangeduid. pMP409DVCBG werd toegepast

- als donorplasmide voor recombinatie met gered vacciniavirus, vP4i0, beschreven in voorbeeld 1. De nieuwe vaccinia-recombinant, aangeduid met vP458, tot expressie brengend het β -galactosidasegen ingevoegd op de M2L deletieplaats, werd gedetecteerd onder toepassing van het chromogene X-gal substraat (9,24) en gezuiverd door herhaalde plaque-kloning.

Kloneren van het EHV-1 gp14 gen.

- Onder verwijzing nu naar figuur 5, omspannt de EHV-1 gp14 coderende volgorde de binding tussen de BamHI restrictiefragmenten a en i (3). De EHV-1 DNA fragmenten BamHI-a (21,3 Kb) en i (7,1 Kb) (59) werden geïsoleerd uit agarosegelen. Plasmide pUC (BamHI-i) werd gevormd door invoeging van het EHV-1 BamHI-i fragment in plasmide pUC8 bij de BamHI plaats. Het EHV-1 BamHI-a fragment werd gedigereerd met EcoRI en gebonden in met EcoRI/BamHI gedigereerde pUC8. Plasmide pUC (BamHI-a/EcoRI) bevat een 10 Kb EHV-1 BamHI/EcoRI inlas. Op basis van de vermelde fragmentafmetingbepalingen (59), wordt opgemerkt dat de DNA volgorden in dit invoegsel grenzen aan die van het BamHI-i fragment in het EHV-1 genoom.

Nucleotide sequence analyses.

- Nucleotide sequence analyses werden uitgevoerd onder toepassing van verschillende subklonen uit pUC (BamHI-a/EcoRI) en pUC (BamHI-i) plasmiden. Sequencing van het plasmide pUC (BamHI-a/EcoRI) werd uitgevoerd op de BamHI plaats, omdat het EHV-1 gp14 gen de BamHI-a/i verbinding omspannt (3). De oriëntatie van het pUC (BamHI-i) plasmide werd bepaald door digeren met restrictieënzym. Aangezien het EHV-1 BamHI eindstandige gedeelte het dichtst bij de EcoRI plaats in pUC (BamHI-i) de BamHI plaats bij de BamHI-a/i verbinding bleek te zijn, werd sequencing van het fragment begonnen vanaf dit BamHI einde.
- Sequence-waarden voor beide strengen werden op de wijze als beschreven in voorbeeld 1 verkregen. De nucleotidevolgorde van het 3,351 bp fragment bevattende de EHV-1

gp14 coderende volgorde is weergegeven in figuur 6. De nummering van de linker en rechter grenzen geldt voor respectievelijk de aminozuur- en nucleïnezuurvolgorde. De vermeende CAT en TATA rechthoeken zijn onderstreept.

- 5 Aminozuren in het signaal en membraan overspannende gebied zijn eveneens onderstreept met de pijl die een potentiële signaalpeptidesplitsingsplaats aangeeft. De dertien potentiële glycosyleringsplaatsen onder toepassing van de consensusvolgorde (Asn-X-Ser/Thr) zijn door een sterretje
10 aangeduid.

- DNA sequence analyses duiden op een open afleesframe dat zich uitstrekt van de nucleotideplaatsen 300 tot 3239 aflezende van links naar rechts ten opzichte van het EHV-1 genoom, dat wil zeggen het ATG startcodon was aanwezig in het BamHI-a/EcoRU fragment en het stopcodon TAA was aanwezig in het BamHI-i fragment (3,59).
- 15

- Vermoedelijke transcriptionale regelsignalen werden aangetroffen in het 5' gebied van het ATG initiëringscodon op plaats 300. Een TATA rechthoek met de volgorde AAATATAT (nucleotiden 148 tot 155) was 70 nucleotiden stroomafwaarts van een vermoedelijke CAT rechthoek op de plaatsen 71-77 met de volgorde GGTCAT geplaatsd. Een polyadenyleringssignaal AATAAA (nucleotiden 3251-3256) was 8 nucleotiden stroomafwaarts van de TAA terminatiecodon (nucleotiden 3240-3242) geplaatsd. Negen van de elf nucleotiden in de volgorde 5'-TCCTGCGCGCA-3' (de nucleotiden 218-228) zijn complementair aan de 18S ribosomale RNA volgorde 3'-AGGAAGCGGT-5' (61) en kunnen dienen als de ribosoombindingsplaats.
- 20
- 25

30

Analyse van de EHV-1 gp14 structuur.

- Het EHV-1 gp14 open afleesframe codeert voor 980 aminozuren met een berekend molecuulgewicht van 109,8 kDa. Analyse van de aminozuurvolgorde duidt op een aantal kenmerken die gebruikelijk zijn voor membraan-geassocieerde glycoproteïnen. Een gebied dat zich uitstrekt van de aminozuren 58 tot 99 had een kenmerkend hydrofobiciteits-
- 35

profiel en het is voorgesteld dat dit de signaalvolgorde is (figuur 6). Een ongebruikelijk aspect van het EHV-1 gp14 genprodukt is dat de lange hydrofobe signaalvolgorde wordt voorafgegaan door een lange hydrofiele volgorde. Dit kenmerk is eveneens opgemerkt voor het pseudorabies virus (PRV) gII (62) en voor het runder herpesvirus 1 (BHV-1) gI gen (63), welke beide eveneens HSV gB homologen zijn. Voorspeld is dat een hydrofoob gebied bestaande uit 45 aminozuren (de aminozuren 826-870) functioneert als een transmembraan ankergebied. Het hydrofiele cytoplasmische gebied bevat 110 aminozuren.

Er zijn elf Asn-X-Thr/Ser (waarin X elk aminozuur, uitgezonderd proline kan zijn) plaatsen voor potentiële, met N-verbonden, glycosylering (64). Een ongebruikelijk aspect is dat er eveneens twee potentiële glycosyleringsplaatsen in het cytoplasmische gebied zijn (figuur 6).

Een hydrofielcitateitsgrafiek van de EHV-1 gp14 coderende volgorde is weergegeven in figuur 7. De hydropathie-index van EHV-1 gp14 is berekend met de methode van Kyte en Doolittle (65) met een raam van zeven aminozuren zonder vereffening. De punten onder de horizontale lijn geven oppervlakken met een grotere hydrofobiciteit aan, waarvoor het potentiaal signaal en/of membraan ontspannende gebieden zijn aangegeven. De kenmerken van een membraan omspannend glycoproteïne omvatten signaal- en ankerelementen en het lange hydrofiele gebied dat voor de signaalvolgorde komt zijn aangetroffen voor de EHV-1 gp14 coderende volgorde.

Lokalisatie van de antigene determinant herkend door het anti-EHV-1 gp14 monoklonale antilichaam, 3F6.

Lambda gt11 expressievector en monoklonale antilichamen waren bruikbaar voor de identificatie van EHV-1 DNA volgorden coderende voor de belangrijkste EHV-1 glycoproteïnen (3). Een lambda gt11 recombinant, 4a1, bleek een EHV-1 gp14 epitoom tot expressie te brengen, herkend door het specifieke, monoklonale antilichaam 3F6 (3).

Teneinde de identiteit van dit epitoom te bepalen, werd het EHV-1 DNA aanwezig in 4a1 sequenced en vergeleken met de DNA volgorde van de EHV-1 gp14 coderende volgorde (fig. 6). Ter sequencing werd het DNA fragment overeenkomende met het
5 EHV-1 gp14 epitoom in het λ gt11 recombinant 4a1 herkend door anti-EHV-1 gp14 monoklonaal 3F6 (3) 4a1 gedigereerd met EcoRI, het EHV-1 fragment geïsoleerd op agarosegelen en gebonden aan de EcoRI plaats van pUC8. DNA sequencing werd op de hiervoor beschreven wijze uitgevoerd met de M13
10 universele voorwaartse en reverse primers.

Uit de nucleotidevolgordelij blijkt dat dit epitoom aanwezig was binnen het gebied van de 66 aminozuren overeenkomende met 107 (Thr) - 172 (Val) van het geduceerde primaire translatieprodukt. Het epitoom is dus
15 binnen het amino-eindstandige gedeelte van het geduceerde EHV-1 gp14 oppervlaktegebied geplaatst.

Vergelijking van de EHV-1 gp14 aminozuurvolgorde met andere herpesvirus glycoproteïnen.

20 Vergelijking van de aminozuursamenstelling van het EHV-1 gp14 gen openbaarde een grote homologie met glycoproteïnen van andere herpesvirussen. Zo is het EHV-1 gp14 homoloog met gII van PRV (62), gI van BHV-1 (63), gII van het varicella-zoster virus (VZV) (66), gB van het herpes
25 simplex virus (HSV) (67,71,72) evenals met glycoproteïnen in het Epstein-Barr virus (EBV) (68) en humaan cytomegalovirus (HCMV) (10).

Oligonucleotide-gerichte mutagenese van het 5'-eindstandige gedeelte van de EHV-1 gp14 coderende volgorde.

30 Onder verwijzing weer naar figuur 5, werd plasmide Blue (KpnI/BamHI) gevormd door invoeging van een KpnI/BamHI fragment uit pUC (BamHI-a/EcoRI) in het plasmide Bluescript SK+ gedigereerd met KpnI/BamHI. Oligonucleotide gerichte
35 mutagenese werd uitgevoerd volgens een modificatie van de werkwijze van Kunkel (17) onder toepassing van uracil-bevattende DNA matrixen uit plasmide Blue (KpnI/BamHI)

- gevormd in de dut ung gastheer E. coli stam CJ236. In het gemutageniseerde plasmide werd een NsiI plaats bij codons 1 en 2 van het EHV-1 gp14 gen gevormd, waarbij de volgorde ATG/TCC (Met/Ser) werd veranderd in ATG/CAT (Met/His). De
- 5 gemuteerde volgorde werd bevestigd met DNA sequence analyse. Het KpnI/BamHI fragment uit de mutant werd overgebracht naar met KpnI/BamHI gedigereerd pUC18 onder vorming van het plasmide pUC (KpnI/BamHI).

- Een plasmide, pUCg14, dat het volledige EHV-1 gp14
- 10 gen met de NsiI plaats mutatie bevatte werd gevormd door invoeging van het EcoRI/BamHI fragment uit pUC (KpnI/BamHI) en met EcoRI/BamHI gedigereerd pUC (BamHI/PstI), een 3,9 Kb subkloon van pUC (BamHI-i).

- 15 Constructie van het chimere donorplasmide pVM2LH6g14.

- pMP409DVC werd geknipt met BglII en verbonden met synthetisch, dubbelstrengs DNA dat de gemodificeerde vaccinia H6 (vroeg/laat) promotor bevatte, beschreven in
- 20 voorbeeld 1, geflankeerd door restrictieplaatsen. De restrictieplaatsen voor NsiI, SacI, PstI en EcoRI werden onmiddellijk stroomafwaarts van het endogene initiatiecodon in de H6 promotor gevormd. In pMG11 is de polylinkervolgorde stroomafwaarts van de H6 promotor ATG CAT GAG CTC TGC
- 25 AGA ATT CGG ATC T. De unieke NsiI plaats, bevattende het H6 initiatiecodon (onderstreept), wordt onmiddellijk gevolgd door de unieke SacI, PstI en EcoRI plaatsen.

- Het EcoRI/NsiI DNA fragment uit pUCg14 bevattende het EHV-1 gebied stroomafwaarts van de EHV-1 gp14 initiatiecodon werd vervangen door het EcoRI/NsiI fragment uit
- 30 plasmide pMG11, aldus vormende plasmide pMRHg14, dat de rechter arm van vaccinia HindIII M, de H6 promotor en de volledige lengte van het EHV-1 gp14 gen bevat. Het HpaI/PstI EHV-1 gp14 bevattende fragment van het plasmide
- 35 pMRHg14 werd overgebracht naar het vectorplasmide pMG11 geknipt met HpaI/PstI, onder vorming van plasmide pVM2LH6g14. pVM2LH6g14 bevat de volledige EHV-1 gp14

coderende volgorde (met codon 2 veranderd van TCC (Ser) in CAT (His) zoals is aangegeven en ongeveer 1,2 Kb EHV-1 DNA stroomafwaarts van het EHV-1 gp14 gen) onder de controle van de H6 promotor, ingevoegd in een rechts tot links oriëntatie met betrekking tot flankerende vacciniavolgorde-
5 ten opzichte van het vacciniagenoom met als doelwit het invoegen van het EHV-1 gp14 gen op de M2L plaats.

Recombinatie werd uitgevoerd onder toepassing van vP458 als reddend virus en pVM2LH6g14 als donorplasmide.
10 Kleurloze plaques werden uitgezocht en geanalyseerd op de aanwezigheid van EHV-1 gp14 coderende volgorde onder toepassing van een specifieke EHV-1 gp14 probe gelabeld met ³²P. Na herhaald plaque-kloneren werd de vaccinia recombinant aangeduid met vP577.

15

Truncatie van de EHV-1 gp14 hydrofiele aanloop-sequenties.

Onder toepassing van variaties van de mutagenese en kloningsmanipulaties, zoals hiervoor is beschreven, werd
20 chimeer donorplasmide pVM2LH6g14-1 geconstrueerd. Ter verkrijging van pVM2LH6g14-1, dat een deletie van de codons 2-34 van EHV-1 gp14 met de substitutie van vier codons, bevat, werd in vitro mutagenese (17) uitgevoerd op plasmide Blue (KpnI/BamHI), onder vorming van een NsiI plaats in
25 codons 32-34 in plaats van in codons 1 en 2. Het NsiI/BamHI fragment uit het nieuw gemutageniseerde Blue (KpnI/BamHI) plasmide werd gesubstitueerd voor het NsiI/BamHI fragment in pVM2LH6g14. Veelvuldige NsiI linkers (New England Biolabs, Beverly, MA) werden gebonden op de NsiI plaats,
30 teneinde het oorspronkelijke ATG in frame te brengen met de rest van de EHV-1 gp14 coderende volgorde. Het uiteindelijk verkregen plasmide, pVM2LH6g14-1, bevat de volgorde
ATG/CAT/GCA/TGC/ATT/GCT....coderende voor Met/His/Ala/-Cys/Ile/Ala....., waarin GCT (Ala) is codon 35 van EHV-1
35 gp14. De rest van het pVM2LH6g14-1 is identiek aan dat in pVM2LH6g14.

Het vaccinia recombinant vP613 werd verkregen door

9900034

recombinatie met het reddend virus vP548 en het donorplasmide pVM2LH6g14-1.

Voorbeeld 3

- 5 Constructie van vaccinia virus recombinanten vP633 en vP634 die elk het paard herpesvirus gp13 en gp14 glycoproteïne tot expressie brengen.

Teneinde vaccinia recombinanten te vormen die zowel gp13 als gp14 EHV-1 glycoproteïnen tot expressie
10 brengen, werd de recombinatie uitgevoerd met vP577 of vP613 als reddend virus en het donorplasmide pVHA6g13 (beschreven in voorbeeld 1) dat het EHV-1 gp13 gen onder de controle van de vaccinia H6 promotor ingevoegd op de HA deletieplaats van vaccinia bevat. Het invoegen van de EHV-1 gp13
15 volgorden in recombinantvirussen werd geïdentificeerd door in situ DNA hybridisatie (25,28). Recombinatie van pVHA6g13 met vaccinia virus recombinant vP577 (bevattende EHV-1 gp14 in volle lengte) vormde de dubbele vaccinia virus recombinant vP633; recombinatie met vP613 (bevattende het truncated EHV-1 gp14) vormde de dubbele vaccinia recombinant vP634. De vaccinia virus dubbele recombinanten vP633 en vP634 werden in plaque gekloond en de aanwezigheid van zowel EHV-1 gp13 als gp14 coderende volgorden werden bevestigd door DNA hybridisatieanalyse en door expressieonderzoekingen (zie hierna).

Immunoprecipitatie van EHV-1 gp13 en gp14 glycoproteïnen tot expressie gebracht in vaccinia virus recombinanten.

- 30 Ter bepaling van de EHV-1 gp13 en gp14 glycoproteïnen tot expressie gebracht door vaccinia virus recombinanten, werden VERO cellen geïnfecteerd met de recombinanten en eiwitten metabolisch gemerkt met ³⁵S-methionine en, zoals beschreven in voorbeeld 1, geïmmunoprecipiteerd. Het specifieke monoklonale antilichaam voor
35 EHV-1 gp13 (14H7) of EHV-1 gp14 (3F6) (3) werd in een verdunning van 1:1000 gedurende 4 uur gebonden bij kamer-

temperatuur. Monsters werden geanalyseerd door SDS polyacrylamide gelelektroforese op een 10 % polymeregel bij 30 mA (constante stroom) gedurende ongeveer 6 uur. Autoradiogrammen werden gemaakt.

- 5 Geen belangrijke produkten werden geïmmunoprecipiteerd door het specifieke anti-EHV-1 gp13 monoklonale 14H7 (3) of door het specifieke anti-EHV-1 gp14 monoklonale 3F6 (3) uit hetzij niet geïnfecteerde VERO cellen of VERO cellen geïnfecteerd met het controle hemagglutinine minus
10 vaccinia virus vP452 (184). Met EHV-1 gp13 geradiolabelde produkten werden neergeslagen met monoklonaal 14H7 uit VERO cellen geïnfecteerd met vP483, een vaccinia recombinant die slechts het EHV-1 gp13 tot expressie brengt of de vaccinia virus dubbele recombinanten die zowel EHV-1 gp13 met hetzij
15 intact gp14, vP633, hetzij getrunceerd gp14, vP634 tot expressie brengt. Er zijn twee produkten van ongeveer 44 en 47 kDa die kunnen worden aangetoond, die enigszins kleiner zijn dan het voorspelde primaire translatieproduct (51 kDa) en een groter produkt van ongeveer 90 kDa dat overeenkomt
20 met een volledig geglycosyleerde vorm van het EHV-1 gp13 genprodukt. Het is belangrijk dat de kwaliteit en kwantiteit van de expressie van EHV-1 gp13 niet wordt beïnvloed door coexpressie van een van de vormen van EHV-1 gp14 in de vaccinia dubbele recombinanten vP633 en vP634.
- 25 VERO cellen werden geïnfecteerd met respectievelijk vP633, vP634, vP613 en vP577 en geïmmunoprecipiteerd met het specifieke anti-EHV-1 gp14 monoklonale 3F6 (3). Met vP633 (bevattende gp14 met volle lengte plus gp13) en met vP577 (bevattende gp14 met volle lengte), werden hoofdbanden
30 bij ongeveer 34, 47, 60-64 en 90 kDa waargenomen; terwijl met vP634 (bevattende truncated gp14 plus gp13) en met vP613 (bevattende truncated gp14) hoofdbanden bij 34, 47, 57, 72-82 en 116 kDa werden waargenomen. Ook nu weer werden geen significante verschillen bij de synthese van
35 EHV-1 gp14 van elke vorm tijdens de co-expressie met EHV-1 gp13 waargenomen.

Immunofluorescentieanalyses van EHV-1 gp13 en gp14
produkten gesynthetiseerd door recombinant vaccinia virus-
sen.

Immunofluorescentie van met recombinant vaccinia-
5 virus geïnfekteerde VERO cellen werd uitgevoerd op de wijze
als beschreven in voorbeeld 1, onder toepassing van EHV-1
gp13 of gp14 specifieke monoklonale antilichamen.

EHV-1 gp13 kon gemakkelijk worden aangetoond op
het oppervlak van VERO cellen geïnfekteerd met de vaccinia
10 recombinanten vP483, vP633 en vP634 evenals intern na
fixatie met aceton. Geen significante interne of oppervlak-
immunoreactiviteit ten opzichte van gp13-specifieke antili-
chamen werd aangetroffen in met vP410, vP577 of vP613
geïnfekteerde cellen. Expressie van EHV-1 gp14 kon makke-
15 lijk worden aangetoond in met aceton gefixeerde VERO cellen
geïnfekteerd met de vaccinia recombinanten vP577, vP613,
vP633 en vP634. Geen significante interne immunofluorescen-
tie ten opzichte van gp14-specifieke antilichamen werd
gevonden bij met vP410 of vP483 geïnfekteerde cellen. Onder
20 toepassing van gp14-specifieke, monoklonale antilichamen,
3F6, werd een zwakke oppervlak immunofluorescentie waarge-
nomen in cellen geïnfekteerd met vP613 of vP634, die de
truncated vorm van EHV-1 gp14 tot expressie brengen en geen
significante oppervlakrespons boven de controle virussen
25 vP410 en vP483 werd verkregen met de recombinant vaccinia
virussen vP577 en vP633, welke het EHV-1 gp14 gen met volle
lengte tot expressie brengen (zie eveneens voorbeeld 8).

Voorbeeld 4

30 **Immunisatie van guinese biggetjes met de vaccinia recombi-
nant vP483.**

Ter bepaling van de immunogeniciteit van het gp13
paard herpes virus genprodukt tot expressie gebracht door
de vaccinia recombinant vP483, werden guinese biggetjes
35 ingeënt met het virus en de aanwezigheid van serum neutra-
liserende antilichamen tegen zowel vaccinia virus als
runder herpesvirus werd onderzocht.

9900034

Men verdeelde 15 guinese biggetjes met een gewicht van ongeveer 450 gram in groepen van vijf. Een groep ontving 1 ml van de vaccinia recombinant ($10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) op dag 0 gevolgd door een 1 ml booster op dag 21 door subcutane injectie. De tweede groep ontving overeenkomstige inëntingen doch met vaccinia vP452 ($10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$). De derde groep werd niet gevaccineerd. Men nam voor de eerste vaccinatie en op de dagen 21 en 35 bloed van alle guinese biggetjes af. Men bereidde sera en onderzocht op de aanwezigheid van neutraliserende antilichamen van zowel vaccinia als EHV-1 (stam Kentucky), onder toepassing van 50 TCIC_{50} virus onderzocht met varkens testiculaire cellen.

Zoals uit tabel 1 blijkt wekt de EHV-1 gp13 vaccinia recombinant vP483 een duidelijke seroconversie bij guinese biggetjes op. Serum neutraliserende titers verkregen met vaccinia virus zijn aangegeven tussen haken in tabel 1. Zowel vaccinia als EHV-1 serum neutraliserende antilichamen kunnen 21 dagen na de eerste injectie worden aangetoond en een significante toename van de titer van serum neutraliserende antilichamen wordt twee weken na een tweede inenting van virus op dag 21 verkregen. Er wordt op gewezen dat de serum vaccinia neutraliserende titers verkregen bij guinese biggetjes die zijn ingeënt met het recombinantvirus dat EHV-1 gp13 tot expressie brengt significant hoger zijn ($t = 7,2$) dan de titers verkregen uit guinese biggetjes die met het vaccinia vP452 zijn ingeënt.

9900034

Tabel 1: Serum neutraliserende antilichamen die aanwezig zijn in guinese biggetjes die zijn ingeënt met hetzij een vaccinia recombinant die EHV-1 gp13 tot expressie brengt of een controle vaccinia virus, vP452.

		<u>Serum neutraliserende titer (log₁₀) op de dagen</u>			
<u>Entvirus</u>	<u>Dier no.</u>	<u>0</u>	<u>21</u>	<u>35</u>	
Niet-ge-vaccineerd	26	0,24 (0,35)	--	0,24 (0,70)	
10 Controles	27	0,24 (0,35)	--	0,56 (1,05)	
	28	0,24 (0,35)	--	0,80 (0,70)	
	29	0,24 (0,35)	--	0,40 (0,70)	
	30	0,24 (0,35)	--	0,32 (0,35)	
Controle	191	0,24 (0,35)	0,36 (0,47)	0,72 (1,75)	
15 Vacciniavirus	192	0,24 (0,35)	0,21 (0,93)	0,24 (2,30)	
vP452	193	0,24 (0,35)	0,48 (0,58)	-- --	
	194	0,24 (0,35)	0,24 (0,82)	0,24 (2,10)	
	195	0,24 (0,35)	-- --	-- --	
Recombinant	186	0,24 (0,35)	0,48 (1,28)	1,20 (2,57)	
20 Vaccinia-	187	0,24 (0,35)	0,72 (1,63)	1,68 (2,57)	
virus vP483	188	0,24 (0,35)	0,24 (1,52)	1,68 (2,57)	
	189	0,24 (0,35)	0,36 (1,40)	1,56 (2,22)	
	190	0,24 (0,35)	0,48 (1,63)	1,56 (3,00)	

25 Voorbeeld 5

Immunisatie van guinese biggetjes met de vacciniarecombinanten vP577 en vP613.

Guinese biggetjes werden geïmmuniseerd ter beoordeling van hun respons tegen EHV-1 gp14 tot expressie gebracht door de vaccinia recombinanten vP577 en vP613. Guinese biggetjes met een gewicht van ongeveer 450 gram ontvingen 10⁵ TCID₅₀ van vP577 of vP613 vaccinia recombinant via de sub-cutane weg, 1 ml op dag 0 en dag 21. Men nam op de dagen 0, 21 en 35 bloed van de guinese biggetjes af, bereidde sera en onderzocht deze op EHV-1 antilichamen. De neutralisatieproeven werden uitgevoerd op varkens testiculaire cellen tegen 50 TCID₅₀ van het EHV-1 virus, stam

9900034

Kentucky. De vaccinia antilichamen werden getitreerd met ELISA onder toepassing van een anti IgG peroxydaseconjugaat.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 2. Er werd
 5 geen serum neutraliserende werking tegen EHV-1 verkregen
 bij guinese biggetjes geïmmuniseerd met de vaccinia recom-
 binant vP577 die de gehele lengte van het EHV-1 gp14 gen
 bevat (geen gegevens vermeld). Aan de andere kant indu-
 ceerden guinese biggetjes geënt met het recombinant vacci-
 10 nia virus, vP613, een truncated EHV-1 gp14 gen tot expres-
 sie brengend, overeenkomstige spiegels van EHV-1 serum
 neutraliserende antilichamen (tabel 2), zoals de vaccinia
 recombinant, vP483, EHV-1 gp13 tot expressie brengend
 (tabel 1). Hoewel EHV-1 serum neutraliserende antilichamen
 15 drie weken na de eerste infectie kunnen worden gedetec-
 teerd, wordt een significantere spiegel twee weken na de
 tweede immunisatie waargenomen (tabel 2). Bij alle geïmmu-
 niseerde dieren werden responsen waargenomen indien vacci-
 nia antilichamen werden onderzocht met ELISA.

20

Tabel 2: Serum neutraliserende antilichamen aanwezig in
 guinese biggetjes ingeënt met een vaccinia recombinant die
 EHV-1 gp14 tot expressie brengt.

25	<u>Serum neutraliserende titer (log₂) op de dagen</u>			
	<u>Entvirus</u>	<u>0</u>	<u>21</u>	<u>35</u>
	Recombinant vaccinia virus	0,4	0,7	1,3
	vP613	0,2	0,7	1,2
		0,2	0,7	1,7
30		0,2	1,1	1,6
		0,2	1,0	1,6
	Niet gevaccineerde	0,2	---	0,4
	controle's	0,6	---	0,4
		0,7	---	0,8
35		0,6	---	0,2
		0,4	---	0,4

9900034

Voorbeeld 6

Bescherming van gevaccineerde hamsters tegen provocatie met EHV-1.

Ter bepaling van de doeltreffendheid van het
5 vaccinia recombinant vP483 dat EHV-1 gp13 tot expressie
brengt werd aan hamsters een primaire of primaire plus
booster vaccinatie toegediend en ze werden, tezamen met een
niet-ingeënte controlegroep of een groep die tweemaal met
een controle vaccinia virus, vP452, waren ingeënt, intrape-
10 ritoneaal geprovoceerd met een hamster aangepaste Kentucky
stam van EHV-1.

Men scheidde 40 Syrische hamsters (40 dagen oud
met een gewicht tussen 55 en 65 gram) in vier groepen.
Groep A ontving een enkele, subcutane (1 ml) inënting van
15 10^6 , 10^6 of 10^4 TCID₅₀ van de vaccinia recombinant vP483,
vijf dieren per dosis. Groep B werd gevaccineerd met vP483
op dag 0 gevolgd door een booster op dag 14. De (1 ml)
primaire en booster doses werden subcutaan toegediend aan
groepen van 5 dieren onder toepassing van 10^6 , 10^6 of 10^4
20 TCIC₅₀. Groep C bestond uit 5 hamsters en deze dieren
ontvingen twee sub-cutane injecties (10^6 TCIC₅₀ per injectie)
op de dagen 0 en 14 van vaccinia vP452. Vijf hamsters
in groep D werden als niet-gevaccineerde controles gehouden.
Alle hamsters ontvingen 200 LD₅₀ van een hamster
25 aangepaste Kentucky stam van EHV-1 via de intraperitoneale
weg 14 dagen na de laatste immunisatie. Overlevenden werden
7 dagen na de provocatie geteld.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 3. Alle
niet-gevaccineerde en met vaccinia vP452 virus gevaccineer-
30 de hamsters stierven binnen 5 dagen provocatie.

9900034

Tabel 3: Bescherming van hamsters gevaccineerd met vaccinia recombinant, EHV-1 gp13 tot expressie brengend, tegen EHV-1 provocatie.

5	<u>Vaccinerend virus</u>			
	<u>Recombinant vaccinia vP483</u>	<u>Controle vaccinia vP452</u>	<u>Geen virus</u>	
	<u>Primaire</u>	<u>Booster</u>	<u>Booster</u>	
	8 6 4	8 6 4	8	
10	Vaccinerende dosis log ¹⁰			
	TCID ₅₀			
	Hoeveelheid	4 1 2	5 2 0	0 0
15	Overlevenden	5 5 5	5 5 5	5 5

Significante spiegels van een bescherming tegen EHV-1 provocatie werden waargenomen bij hamsters die gevaccineerd waren met de vaccinia recombinant vP483 die EHV-1 gp13 tot expressie brengt. Er werden geen significante verschillen in de beschermingsspiegels waargenomen bij hamsters geïmmuniseerd met primaire of primaire plus booster doses. De beschermende dosis (PD₅₀) was gelijk PD₅₀ = 6,32 log₁₀ voor primaire en 6,12 log₁₀ voor primaire plus booster. Desalniettemin werd een 100 %-ige bescherming slechts waargenomen in de groep die twee doses 10⁸ TCID₅₀ recombinant virus ontvingen.

Teneinde het beschermende effect van een vaccinia virus recombinant die EHV-1 gp14 alleen of in combinatie met EHV-1 gp13 tot expressie brengt, werden provocatieonderzoekingen op ingeënte hamsters uitgevoerd. Men entte 20, één dag oude, Syrische hamsters met een gewicht van ongeveer 60 gram elk subcutaan in met 1 ml controle vaccinia virus of met recombinant vaccinia virussen vP483, vP577, vP613, vP633 en vP634 die EHV-1 gp13 en/of gp14 tot expressie brengen. De eerste vaccinatie werd gevolgd door een identieke vaccineringsdosis (pfu/ml (log₁₀)) op dag 14. Alle

hamsters, waaronder niet ingeënte controles, werden 14 dagen na de laatste immunisatie geprovoceerd met een intraperitoneale injectie van 200 LD₅₀ van een EHV-1 hamster geadapteerde Kentucky stam. De overlevenden van de groepen
5 van vijf dieren werden 14 dagen na de provocatie, op welk moment het onderzoek werd beëindigd, berekend. De dosis entstof die 50 % bescherming van de hamsters geeft werd berekend als log₁₀ TCID₅₀/ml entstof.

Zoals uit tabel 4 blijkt zal de vaccinia virus
10 recombinant vP577, die het EHV-1 gp14 gen met volledige lengte tot expressie brengt, de hamsters niet tegen provocatie met een PD₅₀ berekend $\geq 9,0 \log_{10}$ beschermen. Aan de andere kant gaf het truncated EHV-1 gp14 gen, zoals door de
vaccinia recombinant vP613 tot expressie gebracht, een
15 goede bescherming bij provocatie (tabel 4). De berekende PD₅₀ is wat beter (5,2) dan die verkregen met de EHV-1 gp13 tot expressie brengende vaccinia recombinant, vP483 (6,1). Verrassenderwijze gaf de co-expressie van EHV-1 gp13 en gp14, zowel het gp14 gen met volledige lengte als het
20 truncated gp14 gen, in respectievelijk de vaccinia virus recombinanten vP633 en vP634, een aanzienlijk betere beschermende werking vergeleken met die van het EHV-1 glycoproteïne dat alleen tot expressie is gebracht. De
hoeveelheid virusentstof ter verkrijging van een 50 %-ige
25 bescherming van de gevaccineerde hamsters daalde dus sterk indien EHV-1 gp13 en gp14 samen in dezelfde vaccinia virus recombinant tot expressie werden gebracht.

Tabel 4: Bescherming van hamsters gevaccineerd met de vaccinia recombinanten, EHV-1 gp13 en/of gp14 tot expressie brengend, tegen EHV-1 provocatie.

5	Entstof	EHV-1-	Vaccinatiedosis/			PD ₅₀
		proteïnen	Overlevenden			
	vP483	gp13	8/5	6/2	4/0	6,1
	Geen	--	0/0	---	---	---
10	vP577	gp14	8/1	6/0	4/0	≥9,0
	Geen	--	0/0	---	---	---
	vP613	gp14*	8,4/5	6,4/5	4,4/1	5,2
	vP633	gp13 + gp14	8/5	6/3	4/4	4,3
15	vP634	gp13 + gp14*	7,6/5	5,6/5	3,6/5	≤3,6
	Vaccinia	--	8/0	---	---	≥9,0
	Geen	--	0/1	---	---	---

* vP613 en vP634 brengen de truncated versie van EHV-1 gp14 tot expressie.

Voorbeeld 7

Constructie van vogelpokkenvirus recombinanten die het paard herpesvirus gp13 glycoproteïne tot expressie brengen.

25 Onder verwijzing nu naar figuur 8, werd pVHA6g13 toegepast als bron van het EHV-1 gp13 gen. Ter isolering van het DNA segment dat het volledige EHV-1 gp13 gen bevat werd pVHA6g13 gedigereerd met NruI en HindIII. Een fragment van ongeveer 1,8 Kb bevattende 28 bp van het 3' uiteinde
30 van de vaccinia virus H6 promotor, het volledige EHV-1 gp13 gen en ongeveer 410 bp van vaccinia virusvolgorden werd door deze digerering gevormd. Het 1,8 Kb NruI/HindIII fragment werd geïsoleerd voor het invoegen in de vogelpokkenvirusinvoegvectoren pFPCV2 en pCPCV1.

35 De hoenderpestvirus (FP) invoegvector pFPCV2 verschaft een drager voor de vorming van recombinanten die vreemde genen in een niet-essentieel gebied van het FP

genoom aangeduid met het f7 gebied bevat. pFPCV2 werd gevormd uit pRW731.13. Het plasmide pRW731.13 bevat een FP genomisch PvuII fragment van ongeveer 5,5 Kb ingevoegd tussen de twee PvuII plaatsen van pUC9. In het begin werd
5 een veelvoudige kloningsvolgorde (MCS) gebonden aan de unieke HincII invoegplaats in dit 5,5 Kb PvuII FP genomische fragment. De MCS werd verkregen door annealing oligonucleotiden CE4 (5'-TCGCGAGAATTCGAGCTCGGTACCGGGGAT
CCTCTGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGTT-3') en CE5 (5'-
10 AACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTTAGAGGATCCCCGGTACCGA
GCTCGAATTCTCGCA-3'). Het plasmide dat de MCS bevatte werd aangeduid met pCE11.

pFeLV1A is een derivaat van de vaccinia invoegvector pTP15 (184) (fig. 3), waarin het kat leukemievirus (FeLV) env gen (192) is ingevoegd in de PstI plaats stroomafwaarts van de H6 promotor. Voor het overbrengen van de 2,4 kb expressiecassette naar een FP vector (fig. 8) werden de H6/FeLV env volgorden weggenomen uit pFeLV1A door digereeren met BglII en partieel digereeren met PstI. De
20 BglII plaats bevindt zich op de 5' grens van de H6 promotorvolgorde. De PstI plaats is 420 bp stroomafwaarts van het translatie terminatiesignaal voor het FeLV envelop glycoproteïne open afleesframe geplaatst.

De 2,4 Kb H6/FeLV env volgorde werd ingevoegd in
25 pCE11 gedigereerd met BamHI en PstI. Dit plasmide werd aangeduid met pFeLVF1. Het pFeLVF1 plasmide werd daarna gedigereerd met PstI ter verwijdering van de FeLV env volgorden. Het verkregen plasmide dat de vaccinia virus H6 promotor in pCE11 bevatte werd met pFPCV1 aangeduid. De
30 volgorden 5' tot de promotor werden gemutageniseerd (19) ter verwijdering van vreemde volgorden, onder toepassing van oligonucleotide FPCV1 (5'-CAGTAATACGTTATTGCAGAGA
GGACCATTCTTTATTCTATACTAAAAAGT-3') ter verkrijging van pFPCV1. Het 3' gebied naar de promotor (veelvoudige kloningsplaats) werd gemutageniseerd met oligonucleotide FPCV3
35 (5'-TAGAGT CGACCTGCAGGCATCCAAGCTTGTTAACGAC-3') ter verwijdering van de SphI plaats die een ATG bevat. Het verkregen

plasmide werd met pFPCV2 aangeduid.

*Het hiervoor gedefinieerde 1,8 Kb NruI/HindIII EHV-1 gp13 fragment werd ingevoegd in het 8,0 Kb NruI/HindIII fragment, verkregen door digeren van pFPCV2. Dit
8,0 Kb NruI/HindIII fragment bevatte het 5' gedeelte van de
vaccinia virus H6 promotor (100 bp), de FP flankerende
volgorden (4,8 Kb stroomopwaarts en 1,5 Kb stroomafwaarts
van de invoegplaats) en 2,4 Kb pUC (BRL, Bethesda, MD).
Ligatie van deze twee fragmenten leidde tot de vorming van
een 9,8 Kb plasmide aangeduid met pFPEHV13A.

Het plasmide pFPEHV13A werd daarna gedigereerd met
KpnI en HindIII ter verwijdering van een ongeveer 600 bp
fragment. Dit fragment bevatte het 3' meeste gebied van het
EHV-1 gp13 gen (200 bp) en het 410 bp vacciniavirus DNA
segment. Het 600 bp KpnI/HindIII fragment werd op de
volgende wijze vervangen door een 200 bp fragment afgeleid
van pNSIENPN (fig. 3). Een PstI digereering van pNSIENPN
maakte het plasmide lineair. De PstI eindstandige gedeelten
werden blunt-ended door het T4 DNA polymerase (New England
Biolabs, Beverly, MA) in aanwezigheid van dNTPs (0,5 mM
elk). Daarna werden HindIII linkers (BRL, Bethesda, MD)
verbonden tot het blunt-ended fragment. Na digeren met
HindIII werd het lineair gemaakte plasmide gedigereerd met
KpnI, waardoor een 200 bp fragment bevattende het 3'
gedeelte van het EHV-1 gp13 gen werd verkregen, waarbij de
volgorde die overeenkomt met het terminatiecodon (TAG) en
het TTTTNT sequence-motief bekend staat als een vaccinia
virus vroeg transcriptie terminatiesignaal (45). Het
recombinant plasmide werd aangeduid met pFPEHV13B en werd
toegepast bij de in vitro recombinitie voor het invoegen
van het H6 promoted EHV gp13 gen op de f7 plaats van het FP
genoom. Het recombinant vogelpokkenvirus werd aangeduid met
vFP44.

Onder verwijzing naar figuur 9, wordt opgemerkt
dat pFPEHV13B eveneens werd toegepast ter verkrijging van
een 1,4 Kb NruI/HindIII fragment voor het invoegen in
pCPCV1. Het pCPCV1 plasmide bevat de vaccinia virus H6

9900034

promotor op de unike EcoRI plaats in het 3,3 Kb PvuII kanariepökkenvirus (CP) genomische fragment. Dit invoeg-plasmide maakt het invoegen van vreemde genen op de C3 plaats van het CP genoom mogelijk. pCPCV1 werd verkregen uit pRW764.2, dat een 3,3 Kb PvuII CP genomisch fragment ingevoegd in een pUC vector bevat. pRW764.2 werd lineair gemaakt door digereeren met EcoRI. Dit fragment werd blunt-ended onder toepassing van het Klenow-fragment van het E. coli DNA polymerase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) in aanwezigheid van dNTPs (0,5 mM elk). Vaccinia virus H6 promotorvolgorden en een multipel kloningsgebied geplaatst 3' van de promotor werden door digereeren met KpnI/HpaI verwijderd uit pFPCV1. Dit 200 bp fragment werd blunt-ended met T4 DNA polymerase in de aanwezigheid van dNTPs (0,5 mM elk) en ingevoegd in het lineair gemaakte blunt-ended plasmide pRW764.2. Het verkregen plasmide werd aangeduid met pCPCV1. Het plasmide pCPCV1 werd gedigereerd met NruI en HindIII en het 5,8 Kb fragment werd geïsoleerd voor binding met het hiervoor beschreven 1,4 Kb EHV gp13 bevattende fragment. Het verkregen plasmide werd aangeduid met pCPEHV13A. Dit plasmide werd bij in vitro recombinantie-experimenten toegepast voor het invoegen van het H6 promoted EHV gp13 gen in het C3 gebied van het CP genoom. Het recombinant kanariepökkenvirus werd aangeduid met vCP48.

Na de in vitro recombinatie, werd recombinant vogelpökkenvirus bevattende het EHV-1 gp13 gen geïdentificeerd met een standaard plaque hybridisatie-onderzoek. Positieve plaques werden gezuiverd door drie cycli van plaque isolatie, gevolgd door hybridisatie-analyses. Recombinanten werden aangeduid met respectievelijk vFP44 en vCP48 voor FP en CP recombinanten. Beide recombinanten werden geanalyseerd onder toepassing van een Protein A-B-galactosidase immunoscreen assay met een monoklonaal antiserum voor EHV-1 gp13. Uit de resultaten blijkt dat CEF en VERO celmonolagen geïnfecteerd met vFP44 of vCP48 het EHV-1 gp13 op het oppervlak van met virus geïnfecteerde

9900034

cellen tot expressie brengen.

Voorbeeld 8

- 5 Beoordeling van extra vaccinia virus recombinanten die ongemodificeerde en gemodificeerde versies van het gen uit paard herpes virus-1 coderende voor glycoproteïne gp14 tot expressie brengen.

- Constructie en beoordeling van extra recombinant vaccinia virus dat EHV-1 gp14 tot expressie brengt. De EHV-1 gp14 bevattende constructies (voorbeeld 2) werden op drie wijzen gemodificeerd: (a) variëren van de lengte van de EHV-1 gp14 aanloopsequentie, (b) verwijdering van de overmaat EHV-1 DNA 3' uit het gen en (c) invoeging van de gemodificeerde versies van het EHV-1 gp14 gen in een vaccinia virus vP293 gastheertraject selectiesysteem (69) voor de beoordeling.

- Het EHV-1 gp14 genprodukt bevat een ongewoon lange aanloopsequentie. Een lange hydrofobe volgorde die zich uitstrekt over de aminozuren 58-99 wordt voorgesteld als signaalsequentie. Dit gebied wordt voorafgegaan door een lange hydrofiele volgorde. Een overeenkomstig lange aanloopsequentie werd eveneens gevonden voor twee andere gB homologen, pseudorabies virus gII (62) en runder herpesvirus 1 gI (63).

- 25 Modificatie van het 5' uiteinde van EHV-1 gp14.

- Ter bestudering van het effect van de lengte van de aanloopsequentie van EHV-1 gp14 bij het verwerken, aanbieden en voor de immunologische werking van het gp14 produkt tot expressie gebracht in recombinant vaccinia virus, werden plasmiden die het EHV-1 gp14 gen met drie verschillende lengten van de aanloopsequentie geconstrueerd door modificeren van het vroegere EHV-1 gp14 bevattende constructies, hetgeen op de volgende wijzen geschiedde.

- Onder verwijzing naar figuur 10, bevat het plasmide pVM2LH6g14 (voorbeeld 2) de volledige EHV-1 gp14 coderende volgorde onder de controle van de H6 promotor ingevoegd in de Kopenhagen vaccinia M2L deletieplaats. In

- pVM2LH6g14 is aminozuurgetal 2 van het EHV-1 gp14 gen eerder aanwezig als His dan het natieve Ser. Ter verandering van aminozuur 2 in Ser, werd pVM2LH6g14 geknipt met NsiI (herkenningsvolgorde ATGCAT) bij codons 1 - 2 (Met/His). Mutagenese werd uitgevoerd (19) onder toepassing van het synthetische oligonucleotide MPSYN240 (5' ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCCTCGGTGCCGTTCTGTC 3'). Het verkregen plasmide, pMP14M, bevat het volledige EHV-1 gp14 gen met het natieve codon (Ser) op plaats 2.
- Het plasmide pVM2LH6g14-1 (voorbeeld 2) is identiek aan pVM2LH6g14, behalve een truncatie van de aanloopsequentie en invoering van vier codons afgeleid van synthetische NsiI linkers. In pVM2LH6g14-1 is de volgorde van het 5' truncated uiteinde van het EHV-1 gp14 gen ATG/CAT/GCA/TGC/ATT/GCT... coderende voor Met/His/Ala/Cys/Ile/Ala..., waarin GCT (Ala) codon 35 is van EHV-1 gp14. pVM2LH6g14-1 werd gemodificeerd door mutagenese (19) op twee manieren. Ter verkrijging van een versie van het gp14 gen truncated in ongeveer dezelfde mate als pVM2LH6g14-1, doch nauwkeuriger benaderende de natieve gp14 volgorde, werd pVM2LH6g14-1 geknipt met NsiI bij de codons 1 - 2. Mutagenese werd uitgevoerd onder toepassing van het synthetische oligonucleotide MPSYN241. (5' ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAGTGTCCAGCAGCTGGCTCCTGGATC 3')
- In het verkregen plasmide, pMP14M-34 begint de EHV-1 gp14 coderende volgorde met ATG/AGT/GTC/CCA... Met/Ser/Val/Pro..., waarin CCA (Pro) aminozuur 36 van EHV-1 gp14 is. Het EHV-1 gp14 gen bevat een NaeI plaats (GCCGGC) bij de codons 61 - 63 (Lys/Pro/Ala). Ter verkrijging van een meer uitgesproken truncated versie van het EHV-1 gp14 gen, werd pVM2LH6g14-1 lineair gemaakt met NaeI, gevolgd door digeren met NsiI en isolatie van vectorfragment uit een agarosegel. Mutagenese werd uitgevoerd onder toepassing van synthetisch oligonucleotide MPSYN243 (5' ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCATCATCGGGTGGGCACAATAGTT 3')
- In het verkregen plasmide, pMP14M-63, begint de EHV-1 gp14 coderende volgorde met ATG/GCA...Mer/Ala...,

waarin GCA (Ala) aminozuur 63 van het natieve EHV-1 gp14 is.

Verwijdering van vreemd EHV-1 DNA.

5 In alle, hiervoor besproken, EHV-1 gp14 bevattende
plasmiden werden de EHV-gp14 coderende volgorden gevolgd
door ongeveer 1200 bp EHV-1 DNA. Het terminatiecodon (TAA)
voor het gp14 gen treedt op in een DraI plaats (TTTAAA).
Ter verwijdering van overmaat EHV-1 DNA werd pMP14M-63
10 onderworpen aan partiele DraI digestering, gevolgd door
isolatie van lineair DNA uit een agarosegel en digesteren
met PstI, dat knipt bij de verbinding van EHV-1 DNA en de
stroomafwaarts gelegen vaccinia flankerende arm. Een 6,5 Kb
DraI/PstI DNA band werd geïsoleerd uit een agarosegel.

15 Synthetische oligonucleotiden MPSYN247
(5' AAATTTTGTGTTAACTCGAGCTGCA 3') en MPSYN248
(5' GCTCGAGTTAACAAAATT 3') werden annealed en verbonden
met het 6,5 Kb fragment. In het verkregen plasmide, pMP14M-
63P, werden de EHV-1 gp14 coderende volgorden onmiddellijk
20 gevolgd door een volgorde die terminatie van vroege vacci-
nia transcriptie (45) specificiert, gevolgd door een
polylinkergebied (bevattende HpaI, XhoI, PstI restrictie-
plaatsen) en de linker vaccinia flankerende arm verkregen
uit HindIII M.

25

Invoeging van het H6 promotor/EHV-1 gp14 gen in
een pHEs/vP293 selectiesysteem.

In alle hiervoor besproken EHV-1 gp14 bevattende
plasmiden bevindt het EHV-1 gp14 gen zich onder de controle
30 van de vaccinia H6 promotor ingevoegd in het M2L deletiege-
bied van de Kopenhaagse stam van het vaccinia virus.
Aangezien de M2L invoegingsplaats binnen een groter gebied
van het genoom is geplaatst dan kan worden deleted (69),
werd de herplaatsing van de H6 promotor/EHV-1 gp14 expres-
35 siecassette naar een potentieel stabielere invoegplaats
onderzocht. Als voorbereidende stap werden EHV-1 gp14
constructies die verschillende lengten van de aanloopse-

quentie bevatten verplaatst naar het op WR pHES/vP293-gebaseerde gastheertraject-selectiesysteem (69) teneinde een snelle vorming van vaccinia recombinanten voor een vergelijkend onderzoek mogelijk te maken.

- 5 Plasmide pHES-4 bevat de vaccinia H6 promotor, gevolgd door een polylinkergebied en het K1L humaan gastheertrajectgen (70), alle ingevoegd tussen WR vaccinia armen die een 21,7 Kb deletie (69) flankeren. pHES-4 bevat twee NruI plaatsen, één in de H6 promotor en één in de
- 10 flankerende vaccinia volgorden. pHES-4 werd door partieel digereeren met NruI lineair gemaakt en de band die lineair DNA met volle lengte bevatte werd uit een agarosegel geïsoleerd. Dit lineaire DNA werd op de XhoI plaats in het polylinkergebied geknipt. pMP14M-63P bevat twee NruI
- 15 plaatsen, één in de H6 promotor en de andere in EHV-1 gp14 coderende volgorden, 0,2 Kb van het 3' uiteinde van het gen. pMP14M-63P werd lineair gemaakt met NruI, gevolgd door digereeren met XhoI. Een 2,8 Kb NruI (partieel)/XhoI fragment werd uit een agarosegel geïsoleerd. Dit fragment bevat
- 20 een gedeelte van de H6 promotor, gevolgd door de vorm van het gemodificeerde EHV-1 gp14 gen bevattende de kortste versie van de aanloopsequentie. Het 2,8 Kb H6 promotor/EHV-1 gp14 bevattende fragment afgeleid van pMP14-63P werd verbonden met het NruI (partiële)/XhoI vectorfragment
- 25 afgeleid van pHES-4. Het verkregen plasmide, pHES-MP63, bevat de H6 promotor/EHV-1 gp14 gencassette, zonder vreemd EHV-1 DNA. Voor de overdracht van de H6 promotor/RHV-1 gp14 5' uiteinden bevattende de volle lengte of matig truncated aanloopsequenties, werden de plasmiden pMP14M en pMP14M-34
- 30 geknipt met NruI en respectievelijk de 2,8 Kb en 2,7 Kb banden geïsoleerd uit agarosegelen. pHES-MP63 werd onderworpen aan partiële NruI digereering en een 7,2 Kb fragment werd geïsoleerd uit een agarosegel. Het 7,2 Kb vectorfragment komt overeen met pHES-MP63, waaruit het 2,6 Kb NruI
- 35 fragment bevattende het H6 promotor/EHV-1 gp14 5' uiteinde was verwijderd. Het 7,2 Kb NruI (partieel) vectorfragment afgeleid van pHES-MP63 werd verbonden met het 2,8 Kb NruI

fragment uit pMP14M, onder vorming van pHES-MP1. Het 7,2 Kb NruI (partiële) vectorfragment afkomstig van pHES-MP63 werd eveneens verbonden met het 2,7 Kb NruI fragment uit pMP14M-34, onder vorming van pHES-MP34. De kloneringsstappen die
5 leiden tot de vorming van de plasmiden pHES-MP63, pHES-MP1 en pHES-MP34 zijn schematisch weergegeven in figuur 10.

De plasmiden pHES-MP1, pHES-MP34 en pHES-MP63 werden toegepast als donorplasmiden voor recombinatie met
10 vP293 (69), onder vorming van respectievelijk de recombinant vaccinia virussen vP753, vP765 en vP721. Recombinant nakomelingschap werd geselecteerd met humane MRC-5 cellen.

) Beoordeling van de op vP293-gebaseerde vaccinia virus recombinanten die het RHV-1 gp14 gen tot expressie
15 brengen.

Ter bepaling of de drie vormen van het EHV-1 gp14 genprodukt tot expressie gebracht in recombinant vaccinia virussen vP753, vP765 en vP721 aanwezig waren op het oppervlak van geïnfekteerde cellen, werden VERO celmonolagen
20 geïnfecteerd met de drie EHV-1 gp14-bevattende recombinant vaccinia virussen. De geïnfekteerde celmonolagen werden geanalyseerd op oppervlak-immunofluorescentie onder toepassing van het EHV-1 gp14-specifieke monoklonale antilichaam 3F6. Oppervlakimmunofluorescentie was positief
25 voor cellen geïnfecteerd met alle drie vaccinia virale recombinanten vP753, vP765 en vP721. Dit wijst er op dat goed trafficking van het EHV-1 gp14 genprodukt in met vaccinia geïnfekteerde cellen niet wordt beïnvloed door variatie van de lengte van de aanloopsequence.

30 Ter vergelijking van de EHV-1 gp14 genprodukten tot expressie gebracht door de drie EHV-1 gp14-bevattende vaccinia virusrecombinanten, werden MRC-5 cellen geïnfecteerd met vP753, vP765 en vP721 en eiwitten werden metabolisch gelabeld met ³⁵S-methionine. Immunoprecipitaties
35 werden uitgevoerd met de geradiolabelde cellysaten onder toepassing van EHV-1 gp14-specifiek monoklonaal antilichaam 3F6.

- Geïmmunoprecipiteerde eiwitten uit cellen geïnfecteerd met vP753, vP765 en vP721 kunnen niet van elkaar worden onderscheiden en zijn equivalent aan de eiwitten die zijn geïmmunoprecipiteerd uit vP613, de EHV-1 gp14-bevattende vaccinia recombinant gevormd uit plasmide pVM2LH6gl4-1. Uit deze resultaten blijkt dat de variaties in de lengte van de EHV-1 gp14 aanloopsequentie onderzocht in deze recombinanten noch verbeteren, noch invloed uitoefenen op het goed verwerken van het eindproduct.
- Ter beoordeling van de beschermende doeltreffendheid van recombinant vaccinia virus dat de verschillende vormen van EHV-1 gp14 tot expressie brengt, werden hamsters ingeënt met variërende doses vP753, vP765 en vP721 en geprovoceerd met de EHV-1 hamster aangepaste Kentucky stam.
- Alle drie EHV-1 gp14-bevattende vaccinia recombinanten waren beschermend, met een \log_{10} PD_{50} van 6,2 of beter. Verschillen wat betreft de bescherming onder de drie vaccinia virus recombinanten zijn statistisch niet significant.
- In tegenstelling met vP577, vertoonde een volgende vaccinia virus recombinant die eveneens was verkregen door recombinatie van pVM2LH6gl4 en vP458 een identiek EHV-1 gp14 immunoprecipitatiepatroon met dat van vP613, vP753, vP765 en vP721, en, evenals deze EHV-1 gp14 tot expressie brengende recombinant vaccinia virus, bracht het EHV-1 gp14 eiwit op het oppervlak van geïnfecteerde cellen tot expressie.
- De hiervoor vermelde gegevens doen veronderstellen dat het EHV-1 gp14 tot expressie gebracht in vaccinia virus recombinant vP577, onvolkomen is en dat het defect waarschijnlijk optrad tijdens de recombinatie tussen het donorplasmide pVM2LH6gl4 en het vaccinia virus vP458.
- Voorbeeld 9
- De nucleotidevolgorde van drie nieuwe genen uit paard herpesvirus type 1 en expressie in vaccinia virus recombinanten.

- Ter identificatie en isolatie van het EHV-1 gen coderend voor gp17/18 alvorens het tot expressie te brengen in een vaccinia recombinant virus, werd het grootste gedeelte van het U_s gebied van het EHV-1 genoom sequen-
- 5 ced en de verschillende open afleesframe's aangetroffen in dit DNA fragment werden tot expressie gebracht. Drie nieuwe EHV-1 genen gecodeerd door het S bestanddeel werden geïdentificeerd en geanalyseerd: EHV-1 gD dat bij sequentie homologie met de produkten van de HSV gD en PRV gp50 genen
- 10 vertoonde, EHV-1 gp63 dat homologie met de produkten van de HSV US7 en PRV gp63 genen vertoonde en EHV-1 gE dat homologie met de produkten van de HSV gE en PRV genen vertoonde. Alle drie genen, individueel of tezamen, werden gekloneerd in een gastheertrajectselectiesysteem van de Kopenhagen
- 15 vaccinia stam voor snelle expressieonderzoekingen. Uit immunofluorescentie verkregen met een anti-EHV-1 konijn serum bleek de expressie van EHV-1 specifieke produkten.

Kloneren van het EHV-1 BamHI D fragment.

- 20 Zoals het EHV-1 gp17/18 gen werd gelokaliseerd op het S bestanddeel van het EHV-1 genoom (3), werd het BamHI D fragment, dat het grootste gedeelte van het U_s gebied (59) vertegenwoordigt, geïsoleerd en gekloneerd. EHV-1 genomisch DNA van de Kentucky D stam werd gedigereerd met
- 25 BamHI. Het 11,0 Kb BamHI D fragment werd geïsoleerd uit agarosegel (Geneclean, Bio101, Inc., La Jolla, CA) en gekloneerd in plasmide pIBI24 als plasmide pEHVBamHID. Een restrictiemap van dit fragment werd opgesteld (figuur 11).

- 30 Identificatie van DNA volgorden coderende EHV-1 gD, gp63 en gE.

- Nucleotidesequentiewaarden voor beide strengen werden verkregen uit verschillende sub-klonen van het BamHI D fragment dat gesubkloneerd was in pIBI24, zoals is
- 35 beschreven in voorbeeld 1. Volgorden van de verbindingen tussen opeenvolgende fragmenten werden onderzocht op de beginkloon pEHVBamHID. Het PC/GENE software package (Intel-

ligenetics Inc., Mountain View, CA) werd toegepast bij alle sequentiëwaardenanalyses.

DNA sequentieanalyse van de EHV-1 gD, gp63 en gE

5 genen.

De DNA volgordeanalyse van het 6402 bp gebied sequenced van het BamHI D fragment (dat het grootste gedeelte van het unieke, korte gebied vertegenwoordigt) openbaart het voorkomen van ten minste drie volledige open
10 afleesframes die alle van dezelfde streng aflezen. Deze volgorde is weergegeven in figuur 12 als de van rechts 5' naar 3' streng. De basissamenstelling is 50,44 % G + C.

Het eerste open afleesframe (ORF1) loopt van de nucleotideplaatsen 971 tot 2176. Vermeende transcriptionele
15 regulerende signalen werden aangetroffen in het gebied van 5' tot de meest waarschijnlijke ATG initiatiecodon op plaats 971. Een TATA box met de volgende TATATTAA (nucleotiden 871 tot 878) was 60 nucleotiden stroomafwaarts van een vermeende CAT box op de plaatsen 811 - 817 met de
20 volgorde TGACAAT geplaatst. Geen polyadenyleringssignaal (AATAAA) werd stroomafwaarts van de TAA terminatiecodon (nucleotiden 2177 tot 2179) aangetroffen. Zeven van de tien nucleotiden in de volgorde 5' TCCCTTCGCC 3' (nucleotiden 890 tot 899) waren complementair aan de 18S ribosomale RNA
25 volgorde 3' AGGAAGGCGT 5' (61) en kunnen dienen als de ribosoombindingsplaats. Een scanningmodel is voorgesteld waarmee eukaryotische mRNAs translatie initieert (151). De belangrijkste regel van dit model is dat ribosomen binden aan het 5' uiteinde van het mRNA en lineair het mRNA
30 molecuul scannen. Binding aan de translatie-initiatie is gewoonlijk bij het eerste 5' proximale ATG codon, hoewel uitzonderingen zijn waargenomen (152). Een purine op de -3-plaats is essentieel voor translatie-initiëring en de translatie wordt gestimuleerd door C op de plaatsen -1 en
35 -2 wanneer de rest van de volgorde sub-optimaal is (155). De volgordecontext rondom het voorgestelde initiatiecodon AGCATGT (nucleotiden 968 tot 974) kwalificeert zich als een

functionele volgordecontext voor de translatie-initiëring van eukaryotisch mRNA. Er zijn twee andere mogelijke ATG initiëringscodons respectievelijk aanwezig op de plaatsen 989 tot 991 en 992 tot 994. De samenhang van deze twee
5 codons CTTATGATGG kwalificeert zich niet als functioneel voor translatie-initiatie. Het EHV-1 ORF1 codeert voor 402 aminozuren met een berekend molecuulgewicht van 45239 dalton.

10 Analyse van de EHV-1 ORF1 eiwitstructuur.

Analyse van de aminozuurvolgorde leverde een aantal aspecten gemeen met de met membraan geassocieerde glycoproteïnen op. Het gebied dat zich uitstrekt van de aminozuren 1 tot 26 had een kenmerkend hydrofobiciteitsprofiel en is voorgesteld als de signaalvolgorde. Een hydrofoob gebied bestaande uit 24 aminozuren (de aminozuren 351-374) is voorspeld te functioneren als een transmembraan ankergebied. Er zijn vier Asn-X-Thr/Ser (waarin X elk aminozuur, behalve proline, kan zijn) plaatsen voor potentiële, met N-verbonden, glycosylering (157). Het hydrofobiciteitsprofiel van de EHV-1 ORF1 aminozuurvolgorde is weergegeven in figuur 13. De kenmerken van een membraan overspannend glycoproteïne waaronder signaal- en ankerrelementen zijn duidelijk gedefinieerd. Van de twee meest
15 hydrofobe gebieden bij het N- en dichtbij het C-eindstandige gedeelte wordt voorspeld dat ze respectievelijk de signaalvolgorde en het transmembraan overspannend gebied van het glycoproteïnmolecuul weergeven.

30 Vergelijking van de EHV-1 ORF1 aminozuurvolgorde met andere herpesvirusglycoproteïnen.

Vergelijking van de aminozuursamenstelling van het vermoedelijke EHV-1 ORF1 eiwit duidt op een significante homologie met glycoproteïnen van andere herpesvirussen. Zo
35 komt het EHV-1 ORF1 proteïne overeen met PRV gp50 (95) en HSV-1 gD (79, 160).

Het tweede open afleesframe (ORF2) strekt zich

uit van de nucleotideplaatsen 2287 tot 3525. Geen veronderstelde transcriptionele regulerende signalen werden in het gebied 5' tot het ATG initiatiecodon op plaats 2287 aangetroffen. Geen AATAAA polyadenyleringssignaal werd stroomafwaarts van het TGA terminatiecodon (de nucleotiden 3526 - 3528) gevonden, doch twee potentiële YGTGTTY polyadenyleringssignalen (180) zijn stroomafwaarts van dit terminatiecodon bij ongeveer 40 en 70 bp aangetroffen. Het volgordeverband rondom het voorgestelde initiëringcodon GCTATGG komt overeen met de regels van Kozak (151, 155). Er zijn ten minste twee andere mogelijke ATG initiëringcodons op de plaatsen 2305 - 2307 en 2332 tot 2334, doch het volgordeverband van deze twee codons (GGGATGT en TCTATGG) kwalificeert niet als functioneel voor translatie-initiatie. Het EHV-1 ORF2 codeert een polypeptide met 413 aminozuren met een berekend molecuulgewicht van 45431 dalton.

Analyse van de EHV-1 ORF2 eiwitstructuur.

Analyse van de aminozuurvolgorde biedt een aantal aspecten die gewoon zijn voor de met membraan geassocieerde glycoproteïnen. Een gebied dat zich uitstrekt van de aminozuren 1 tot 22 had een kenmerkend hydrofobiciteitsprofiel en dit wordt voorgesteld als de signaalvolgorde (hoewel de computerscore voor de veronderstelde splitsingsplaats gering was). Een hydrofoob gebied bestaande uit 32 aminozuren (de plaatsen 315-346) functioneert volgens voorspellingen als een transmembraan-anker gebied. Er zijn zeven Asn-X-Thr/Ser plaatsen voor potentiële N-gebonden glycosylering. Een hydrofobiciteitsgrafiek van de EHV-1 ORF2 aminozuurvolgorde is weergegeven in figuur 14. De kenmerken van een membraan overspannend glycoproteïne waaronder signaal- en anker elementen zijn duidelijk gedefinieerd. De twee meest hydrofobe gebieden bij het N-eindstandige gedeelte en dichtbij het C-eindstandige gedeelte geven volgens voorspellingen respectievelijk de signaalvolgorde en het transmembraan overspannende gebied van het glycoproteïnmolecuul aan.

Vergelijking van de EHV-1 ORF2 aminozuurvolgorde met andere herpesvirus glycoproteïnen.

Uit een vergelijking van de aminozuursamenstelling van het EHV-1 ORF2 bleek de significante homologie met glycoproteïnen van andere herpesvirussen. Zo is het EHV-1 ORF2 eiwit homoloog met PRV gp63 (80), VZV gpIV (181) en HSV-1 US7 (79).

Het derde open afleesframe (ORF3) strekt zich uit van de nucleotideplaatsen 3796 tot 5451. Vermoedelijke transcriptionaal regulerende signalen werden aangetroffen in het gebied van 5' tot het ATG initiatiecodon op plaats 3796. Een TATA box met de GTTTAAA volgorde (de nucleotiden 3705 - 3711) was 50 nucleotiden stroomafwaarts van een vermoedelijke CAT box op de plaatsen 3649 - 3654 met de GCAATG volgorde geplaatst. Geen evident polyadenyleringssignaal werd stroomafwaarts van het TGA terminatiecodon (de nucleotiden 5452 - 5454) aangetroffen. Het volgordeverband rondom het voorgestelde initiatiecodon ACAATGG komt overeen met de regels van Kozak (151, 155). Het EHV-1 ORF3 codeert voor een polypeptide met 552 aminozuren met een berekend molecuulgewicht van 61493 dalton.

Analyse van de EHV-1 ORF3 eiwitstructuur.

Uit analyse van de aminozuurvolgorde blijkt een aantal aspecten die gemeenschappelijk met de membraangeassocieerde glycoproteïnen te zijn. Een gebied dat zich uitstrekt van de aminozuren 1-23 had een kenmerkend hydrofobiciteitsprofiel en is voorgesteld als signaalvolgorde. Een hydrofoob gebied bestaande uit 38 aminozuren (de plaatsen 404-437) functioneert volgens voorspellingen als een transmembraan-anker gebied. Er zijn vijf Asn-X-Thr/Ser plaatsen voor potentiële, met N-gebonden glycosylering. Een hydrofobiciteitsgrafiek van de EHV-1 ORF3 aminozuurvolgorde is weergegeven in figuur 15. De kenmerken van een membraan overspannend glycoproteïne waaronder signaal- en ankerelementen zijn duidelijk gedefinieerd. Van de twee meest hydrofobe gebieden bij het N- en dichtbij het C-eindstandi-

ge gedeelte is voorspeld dat ze respectievelijk de signaalvolgorde en het transmembraan overspannend gebied van het glycoproteïnmolecuul weergeven.

5 Vergelijking van de EHV-1 ORF3 aminozuurvolgorde met andere herpesvirus glycoproteïnen.

Uit een vergelijking van de aminozuursamenstelling van het EHV-1 ORF3 proteïne blijkt een significante homologie met de glycoproteïnen van andere herpesvirussen. Zo is
10 het EHV-1 ORF3 eiwit homoloog met PRV gI (80), VZV gE (181) en HSV-1 gE (79).

Constructie van een op Kopenhagen vaccinia virus gebaseerd gastheertraject-selectiesysteem.

15 Een op Kopenhagen vaccinia virus gebaseerd gastheertraject-selectiesysteem analoog aan het WR pHES/vP293 gastheertraject-selectiesysteem (69) werd geconstrueerd.

De Kopenhagen vaccinia virusdeletiemutant vP668 is
20 deleted voor 12 genen uit het HindIII C - HindIII K gebied, waaronder beide humane gastheertrajectgenen KIL (70) en C7L, een gen dat behoort tot HindIII C.

vP668 is niet in staat om op humane MRC-5 cellen te groeien. Leden van de COPCS plasmide serie bevatten het
25 C7L gen zonder flankerende vaccinia armen, waardoor recombinaatie met vP668 en herstel van het vermogen van het virus om op MRC-5 cellen te groeien wordt hersteld. Het vermogen van de recombinant vaccinia nakomenschap gevormd door recombinaatie onder toepassing van het vP668/COPCS gastheertraject-selectiesysteem om een plaque te vormen op humane
30 MRC-5 cellen verschaft een methode voor snelle identificatie van deze recombinanten. Plasmide pCOPCS657 bevat de synthetische H6 vaccinia promotor gevolgd door een polylinker kloneringsgebied voor het invoegen van vreemde genen.
35 Het polylinkergebied wordt gevolgd door stopcodons en een vaccinia transcriptionaal terminatiesignaal (45).

Kloneren van het EHV-1 gD gen tot pCOPCS657.

Onder verwijzing naar figuur 16, werd het plasmide pEHVBamHID gedigereerd met HindIII en een 1240 bp HindIII DNA fragment bevattende EHV-1 gD werd geïsoleerd uit een
5 agarosegel (Geneclean, Bio10, Inc., La Jolla, CA) en hersteld onder toepassing van het Klenow fragment van DNA polymerase. Het herstellende fragment werd daarna gebonden aan plasmide pCOPCS657 gedigereerd met SmaI. Het verkregen plasmide, pJCA006 had het ATG initiatiecodon ongeveer 10 bp
10 van de H6 promotor (figuur 16).

Kloneren van het EHV-1 gp63 gen tot pCOPCS657.

Plasmide pEHVBamHID werd gedigereerd met HindIII, EcoRI en PvuII en het 1300 bp HindIII-PvuII DNA fragment
15 dat EHV-1 gp63 bevatte werd geïsoleerd uit een agarosegel en hersteld met Klenow. Het herstellende fragment werd daarna verbonden met het plasmide pCOPCS657 gedigereerd met SmaI. Het verkregen plasmide met EHV-1 gp63 in de juiste oriëntatie ten opzichte van de H6 promotor werd met pJCA008
20 (figuur 16) aangeduid.

Kloneren van het EHV-1 gE gen tot pCOPCS657.

Plasmide pEHVBamHID werd gedigereerd met AatII en ApaI en een 2630 bp AatII-ApaI DNA fragment bevattende EHV-
25 1 gE werd geïsoleerd uit een agarosegel en hersteld met Klenow. Het herstellende fragment werd daarna gevoegd in het plasmide pCOPCS657 gedigereerd met SmaI. Het verkregen plasmide met het EHV-1 gE gen in de juiste oriëntatie ten opzichte van de H6 promotor werd aangeduid met pJCA007
30 (figuur 16).

Klonen van het EHV-1 gD-gp63 fragment in pCOPCS657.

Onder verwijzing naar figuur 17, werd het plasmide
35 pEHVBamHID gedigereerd met EcoRI en PvuII en het 1832 bp EcoRI-PvuII DNA fragment (A) werd uit een agarosegel geïsoleerd. Plasmide pJCA006 werd gedigereerd met ClaI en

- EcoRI en het 1450 bp ClaI-EcoRI DNA fragment (B) werd geïsoleerd uit een agarosegel. Plasmide pCOPCS657 werd gedigereerd met ClaI en SmaI en het 3700 bp ClaI-SmaI DNA fragment (C) werd geïsoleerd uit een agarosegel. De fragmenten A, B en C werden daarna samen gekoppeld en het verkregen plasmide werd aangeduid met pJCA009 (figuur 17).

Kloneren van het EHV-1 gD-gp63-gE fragment in pCOPCS657.

- Het plasmide pEHVBamHID werd gedigereerd met EcoRI en SacII en het 4240 bp EcoRI-SacII DNA fragment (D) werd uit een agarosegel geïsoleerd. Daarna werd fragment D gekoppeld aan fragmenten B en C (zie hiervoor) onder additie van dNTPs ter verzekering van het herstel van de binding SacII-SmaI. Het verkregen plasmide werd aangeduid met pJCA010 (figuur 17).

Constructie van de recombinant vaccinia virussen vP773, vP803, vP809, vP810 en vP822 die de EHV-1 U open afleesframe's tot expressie brengen.

- Teneinde snel de expressie van de hiervoor beschreven EHV-1 open afleesframe's na te gaan, werd een aantal vaccinia recombinant virussen geconstrueerd onder toepassing van het COPCS gastheertraject-selectiesysteem. De drie open afleesframe's geïdentificeerd uit de sequence analyse werden afzonderlijk of tezamen ("dubbel" en "driedvoudig") in plasmide pCOPCS657 (figuren 16, 17) gekloneerd. De verkregen plasmiden werden daarna toegepast voor recombinatie met vaccinia recombinant vP668 als reddend virus. De verschillende recombinant vaccinia virussen uit deze recombinaties zijn weergegeven in tabel 5.

- Vaccinia recombinant vP773 werd verkregen bij recombinatie uitgevoerd met het donorplasmide pJCA006 dat het EHV-1 gD gen bevatte. Vaccinia recombinant vP822 werd verkregen door recombinatie uitgevoerd met donorplasmide pJCA008 bevattende het EHV-1 gp63 gen. Vaccinia recombinant vP803 werd verkregen bij recombinatie uitgevoerd met het

donorplasmide pJCA007 bevattende het EHV-1 gE gen. Vaccinia recombinant vP809 werd verkregen door recombinatie uitgevoerd met het donorplasmide pJCA009 bevattende het EHV-1 gD-gp63 fragment en vaccinia recombinant vP810 werd verkregen door recombinatie uitgevoerd met het donorplasmide pJCA010 bevattende het EHV-1 gD-gp63-gE fragment (tabel 5).

Immunofluorescentieanalyse van EHV-1 ORF1 (gD), ORF2 (gp63) en ORF3 (gE) produkten gesynthetiseerd door enkelvoudige of veelvoudige recombinant vaccinia virussen.

Immunofluorescentie van met recombinant vaccinia virus geïnfecteerd VERO en MRC-5 cellen werd uitgevoerd op de wijze zoals beschreven in voorbeeld 1, onder toepassing van anti-EHV-1 specifiek polyklonaal konijnenserum R5935 (1:200) (tabel 6).

Tabel 5: Aanduiding van vaccinia virus recombinanten die EHV-1 gD, Ge en gp63 genen tot expressie brengen.

	Donor- <u>plasmide</u>	EHV-invoeg- <u>sel</u>	Reddend virus	Recombinant
20	pJCA006	gD	vP668	vP773
	pJCA007	gE	vP668	vP803
	pJCA008	gp63	vP668	vP822
25	pJCA009	gD-gp63	vP668	vP809
	pJCA010	gD-gp63-gE	vP668	vP810

Tabel 6: Immunofluorescentie van met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen uitgevoerd onder toepassing van anti-EHV-1 konijn serum R5935.

5	<u>EHV-1 recombinant</u>	<u>R5935</u>	
		intern	oppervlak
	gD	positief	negatief
	gp63	positief	negatief
10	gE	negatief	negatief
	gD-gp63	positief	negatief
	gD-gp63-gE	positief	negatief

Voorbeeld 10

15 Immunologische beoordeling bij muizen en varkens van pseudorabiesvirus glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50, individueel of in combinatie met vaccinia virus recombinanten tot expressie gebracht.

20 De Kopenhagenstam van vaccinia virus en de derivaten vP410, vP425 en vP458 (184) daarvan werden bij dit voorbeeld toegepast.

Kloneren van de PRV gen coderend gpII, gpIII en gp50 .

25 PRV NIA, virus (182) werd gekweekt op NIL₂ celcultuur (183). Celafval werd verwijderd uit de bovenstaande vloeistof door 30 minuten te centrifugeren bij 3000 g. De virusdeeltjes werden gezuiverd door 60 minuten te centrifugeren door een 40 (gew./vol.) %-ig sucrosekussen bij

30 40.000 omwentelingen per minuut in een 45 Ti Beckman rotor gevolgd door een discontinue 30-50 (gew./vol.) %-ige sucrosegradiënt (SW25 Beckman rotor bij 23.000 opm. gedurende 5 uur). Bandvormige virusdeeltjes werden verzameld, verdund met TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 150 mM NaCl

35 en 10 mM EDTA) en 1 uur bij 30.000 opm. in een SW40 Beckman rotor omgezet in een persstukje. Het virale persstukje werd weer gesuspenderd in TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10

mM EDTA) en gelyseerd door toevoegen van natriumdodecylsulfaat tot een eindconcentratie van 0,5 % (gew./vol.) en proteïnase K tot 100 mg/ml. Na 2 uur incuberen bij 37°C werd het lysaat éénmaal geëxtraheerd met een mengsel van fenol en chloroform (1:1) en éénmaal met een mengsel van chloroform en isoamylalkohol (24:1). Het DNA werd neergeslagen met ethanol en weer opgelost in water. Na een volledige digerering met BamHI werden de fragmenten gekloond in de BamHI plaats van pBR322 dat vooraf was behandeld met kalfsdarm alkalische fosfatase (CIAP). Het ligatiemengsel werd toegepast voor de transformatie van de competente E. coli stam NM522 (20).

Onder verwijzing naar de figuren 18 en 19, is de DNA volgorde coderende het gpII gen aanwezig in het BamHI fragment 1 en de SalII subfragmenten 1A en 1B van het PRV genoom (62, 94). Het plasmide aangeduid met pPR9.25 bevattende het PRV BamHI fragment 1 ingevoegd op de BamHI plaats van pBR322 werd gedigereerd met NcoI. Het verkregen DNA gedigereerde produkt werd gefractioneerd over een 0,8 % agarosegel en een 6,2 Kb NcoI DNA fragment werd gezuiverd onder toepassing van de Gene Clean™ procedure (Bio101, Inc. La Jolla, CA) en daarna ingevoegd in de NcoI plaats van pBR328 (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) behandeld met CIAP. Het verkregen plasmide pPR2.15 werd gedigereerd met SphI en gefractioneerd met een agarosegel. De 2,7 en 1,8 Kb fragmenten werden gezuiverd en ingevoegd op de SphI plaats van gefosfataseerde pUC18 ter vorming van de plasmiden pPR1 en pPR2 (fig. 18) en in de M13 faag. De nucleotidevolgorde werd op de hiervoor beschreven wijze bepaald. Uit DNA sequence analyse bleek dat een open afleesframe van 2742 bp coderende voor 913 aminozuren aanwezig was. Zoals verwacht werd een significante aminozuurhomologie met HSV-1 gB waargenomen (62). Ter vergemakkelijking van de beschrijving van de kloningshandelingen voor de expressie van PRV gpII in vaccinia virusvectoren, is de DNA volgorde van het PRV gpII open afleesframe plus extra 5' en 3' niet-coderende volgorden weergegeven in figuur 19.

Onder verwijzing naar de figuren 20 en 21 wordt opgemerkt, dat de DNA volgorde coderende het PRV glycoproteïne gpIII aanwezig is in de BamHI fragmenten 2 en 9 van het PRV genoom (96). Het plasmide pPR9,9 bevattende het BamHI fragment 2 ingevoegd op de BamHI plaats van pBR322 (fig. 20) werd gedigereerd met BamHI en SphI. Het plasmide pPR7,5 bevattende het BamHI fragment 9 ingevoegd op de BamHI plaats van pBR322 werd gedigereerd met NcoI en BamHI. Het DNA verkregen bij beide digereringen werd gefractioneerd over een agarosegel. Het 2,35 Kb SphI-BamHI fragment en het 1,1 Kb NcoI-BamHI fragment werden gezuiverd en gekoppeld met de EcoRI-SphI plaatsen van gefosfataaseerd IBI25 (fig. 20) onder toepassing van een NcoI-EcoRI gefosforyleerde linker MRSYN21/MRSYN22

15			<u>Nco</u> I		<u>Eco</u> RI
	MRSYN21	5'	CATGGGTCTGCAGTCG		3'
	MRSYN22	3'	CCAGACGTCAGCTTAA		5'

Een plasmide aangeduid met pPR17 werd geïsoleerd, dat een 3450 bp SphI-NcoI fragment waaronder het volledige PRV gpIII gen (fig. 20) bevatte. De nucleotidevolgorde werd verkregen uit dubbelstrengs plasmide matrijzen gedenatureerd met alkali en uit enkelstrengs matrijzen na kloneren in de M13 faag. De DNA sequence analyse leverde een open afleesframe van 1440 bp coderende 479 aminozuren op (fig. 21). Significante homologie met HSV gC, werd waargenomen zoals hiervoor reeds werd vermeld (96).

Onder verwijzing naar de figuren 22 en 23 wordt opgemerkt, dat de DNA volgorde coderende het PRV glycoproteïne gp50 aanwezig is in het BamHI fragment 7 van het PRV genoom (95). Plasmide pPR7.1 (fig. 22), bevattende het PRV BamHI fragment 7 ingevoegd op de BamHI plaats van pBR322 werd gedigereerd met StuI en NdeI en behandeld met Mung beannuclease. Het 1,7 Kb fragment werd gezuiverd uit een agarosegel en ingevoegd op de HincII plaats van gefosfataaseerd IBI25. Dit plasmide, pPR22, (fig. 22) bevat het volledige PRV gp50 gen. Bepaling van de nucleotidevolgorde

levert een 1215 bp open afleesframe coderende voor 404 aminozuren (fig. 23) op. Er werd een significante homologie met het HSV-1 gD waargenomen, zoals hiervoor reeds werd vermeld (95).

5

Kloneren van de PRV genen coderende gpII, gpIII en gp50 in vaccinia virus invoegdonorplasmiden.

Het 1060 bp PRV SphI-NheI fragment uit pPR1 (fig. 18A) werd geïsoleerd uit een agarosegel en ingevoegd op de 10 BamHI-SphI plaatsen van pIBI25 na behandeling met CIAP onder toepassing van een BamHI-NheI gefosforyleerde linker MRSYN1/MRSYN2

		<u>BamHI</u>	<u>NheI</u>	
	MRSYN1	5'	GATCCATTCATGGTTG	3'
15	MRSYN2	3'	GTAAGGTACCAACGATC	5'

ter vorming van het plasmide pPR6 (fig. 18A).

pPR6 werd gedigereerd met HindIII en ApaI en behandeld met CIAP. De ApaI plaats is 32 bp stroomafwaarts van het ATG initiatiecodon van PRV gpII (fig. 19) aanwezig. 20 Een dubbelstrengs DNA fragment werd verkregen door annealing het paar synthetisch gefosforyleerde oligonucleotiden MRSYN3/M[RSYN4]. Dit fragment bevat DNA specificerende de vaccinia H6 promotor uit de EcoRV plaats via het ATG (onderstreept), onmiddellijk gevolgd door PRV gpII coderen- 25 de volgorden.

		<u>HindIII</u> <u>EcoRV</u>	<u>ApaI</u>
	MRSYN	5'	AGCTTGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCCCGCTGGTGGCGGTC-TTTGGCGCGGGCC 3'
30	MYSYN4	3'	ACTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACGGGCGACCAACGCCAGAAA-CCGCGC 5'

Het synthetische DNA werd gekoppeld aan het 3920 bp HindIII-ApaI fragment afgeleid van pPR6 ter verkrijging van het plasmide pPR9 (fig. 18A).

35 Het plasmide pPR9 werd gedigereerd met BamHI en NheI, behandeld met CIAP en gekoppeld onder toepassing van een gefosforyleerde BamHI-SphI linker.

9900034

SphI BamHI

MRSYN7 5' CCCAGATCTCCTTG 3'

MRSYN8 3' GTACGGGTCTAGAGGAACCTAG 5'

tot een 1640 bp SphI-NheI fragment verkregen uit pPR1
5 vormend het plasmide pPR12 (figuren 18A, 18B).

Het 1030 bp HincII-SphI fragment uit pPR2 (fig. 18A) werd geïsoleerd uit een agarosegel en ingevoegd op de HincII-SphI plaatsen van gefosfataseerde pUC18. Het verkregen plasmide pPR10 werd gedigereerd met HindIII en NaeI en
10 behandeld met CIAP. De NaeI plaats bevindt zich 44 bp stroomopwaarts van het TAG terminatiecodon (fig. 19). Een dubbelstrengs DNA fragment verkregen door annealing het paar gefosforyleerde synthetische oligonucleotiden MRSYN9/-
MRSYN10

15 NaeI XmaIII HindIII

MRSYN9 5' GGCCTACCAGCGCCTCGAGAGCGAGGACCCGACGCCCTGTAGAA-
TTTTTATCGGCCGA 3'

MRSYN10 3' CCGTGATGGTTCGCGGAGCTCTCGCTCCTGGGCTGCGGACATCT-
TAAAAATAGCCGGCTTCGA 5'

20 werd gekoppeld aan het 3720 bp NaeI-HindIII fragment, afgeleid van pPR10, ter vorming van het plasmide pPR11.

De onderstreepte volgorden komen overeen met het PRV gpII terminatiecodon en met een vaccinia vroeg transcriptieterminatiesignaal (45). Het 770 bp SphI-HincII
25 fragment uit pPR2 werd gezuiverd uit een agarosegel en ingevoegd onder toepassing van een BamHI-SphI gefosforyleerde linker (MRSYN7/MRSYN8) op de BamHI-HincII plaatsen van met CIAP behandeld pPR11 ter vorming van pPR13 (figuren 18A, 18B). Plasmide pPR12 gedigereerd met EcoRI en SphI en
30 behandeld met CIAP werd gekoppeld onder toepassing van een gefosforyleerde HindIII-EcoRI linker (MRSYN19/MRSYN20)

HindIII EcoRI

MRSYN19 5' AGCTTCTGCAGCCATGGCGATCGG 3'

MRSYN20 3' AGACGTCGGTACCGCTAGCCTTAA 5'

35 tot een 990 bp HindIII-SphI geïsoleerd fragment afgeleid van pPR13, ter vorming van het plasmide pPR15 (fig. 18B).

Het met HindIII-EcoRV gedigereerde 2780 bp frag-

ment uit pPR15 werd behandeld met Mung beannuclease, gezuiverd uit een agarosegel en ingevoegd in plasmide pTP15 (184) (fig. 3), dat was gedigereerd met XmaIII-EcoRV, Mung beannuclease en CIAP ter vorming van plasmide pPR18 (fig. 18B). In pPR18 is PRV gpII gekoppeld met de synthetische vaccinia H6 promotor op de vaccinia hemagglutinine deletieplaats. Dit plasmide werd door transfectie gebracht in met vaccinia virus geïnfecteerde cellen, ter vorming van de vaccinia recombinanten VP534, VP644, VP621 en VP692 bevattende het PRV gpII gen (zie hierna).

Het PRV gpIII gen werd gemanipuleerd teneinde het tot expressie te brengen onder de controle van de vroege vacciniavirus promotor, μ , (zie hierna) aanwezig in het vaccinia HindIII B fragment. Onder toepassing van plaats-specifieke mutagenese, werd een NsiI plaats ingevoerd door verandering van de volgorde CGC (basen 192-194) (fig. 21) in PRV gpIII tot ATG en een XbaI plaats werd ingevoerd door wijziging van de volgorde GTGACGT in TTCTAGA (basen 1632-1638) (fig. 21). Hiertoe werd dit enkelstrengs DNA gevormd uit plasmide pPR17 onder toepassing van een helperfaag R408 (Stratagene, La Jolla, CA) (185). De plaatsgerichte mutagenese werd uitgevoerd onder toepassing van twee gezuiverde, gefosforyleerde, synthetische oligonucleotiden MRSYN5 en MRSYN6.

25 NsiI
MRSYN 5' GCGAGCGAGGCCATGCATCGTGCGAATGGCCCC 3'
XbaI
MRSYN 5' GGGGGGACGCGCGGGTCTAGAAGGCCCCGCTGGCGG 3'
en selectie op E. coli dut ung stam CJ236 (IBI, New Haven,
30 CT) (17,186).

Deze mutaties vormden plasmide pPR28. Plasmide pPR28 werd gedigereerd met NsiI en XbaI en behandeld met Mung beannuclease. Een 1440 bp fragment werd gezuiverd uit een agarosegel en ingevoegd op de BglII-HpaI plaatsen van
35 pSD478VC (figuren 20, 24) na behandeling met Mung beannuclease en CIAP. Plasmide pPR24 werd via transfectie gebracht in met vaccinia virus geïnfecteerde cellen ter

vorming van vaccinia virus recombinanten vP604, vP644, vP691 en vP692 bevattende het PRV gpIII gen (zie hierna).

PRV gp50 werd gemanipuleerd teneinde dit tot expressie te brengen onder de controle van een vroege/intermediaire vaccinia virus promotor, I3L (187). Onder toepassing van plaats-specifieke mutagenese, werd een NsiI plaats ingevoerd door verandering van de volgorde CCTGCCAGCGC (basen 177-187) (fig. 23) in gp50 tot ATGCATTTAAT en een BglII plaats werd ingevoerd door verandering van de volgorde CCTCCGAGTACCGG bij de basen 1404-1418 (fig. 23) in AATTTTATAGATCT. Eerder beschreven methoden (17, 185, 186) van mutagenese werden toegepast ter verkrijging van plasmide pPR29 uit pPR22 onder toepassing van gezuiverde, gefosforyleerde, synthetische oligonucleotiden MRSYN12 en MRSYN13 (fig. 22).

NsiI

MRSYN12 5' GGTTCGCATACACTCAATGCATTTAATCATGCTGCTCGCAGCGC 3'

MRSYN13 5' GCAGCCCGGTCCGTAGAAATTTTATAGATCTCGTCGATGAT-

GATGGT 3'

pPR29 werd gedigereerd met NsiI, behandeld met Mung beannuclease en gedeeltelijk gedigereerd met BglII ter vorming van een 1290 bp fragment. Plasmide pMP13PP (figuren 22, 25) werd gedigereerd met EcoRI, behandeld met Mung beannuclease en daarna met BamHI, ter verkrijging van een 140 bp fragment bevattende de vaccinia I3L promotor. De 1290 en 140 bp fragmenten werden gezuiverd uit agarosegelen en gekoppeld aan de gefosfataseerde BglII plaats van pMP409DVC (figuren 4, 22). Het verkregen plasmide, pPR26, werd toegepast in recombinatie ter verkrijging van de vaccinia virus recombinanten vP591, vP621, vP691 en vP692 bevattende het gp50 gen (zie hierna).

Constructie van vaccinia recombinanten die individueel of in combinaties de PRV glycoproteinen gpII, gpIII en gp50 tot expressie brengen.

Ter bepaling van de immunogeniciteit en de rela-

tieve bijdrage van de drie PRV glycoproteïnen (gpII, gpIII en gp50) voor de bescherming van geïmmuniseerde dieren tegen virulente PRV provocatie, werd een reeks vaccinia recombinanten geconstrueerd die de drie PRV glycoproteïnen

- 5 alleen of in combinatie tot expressie brengen.

- Onder verwijzing naar figuur 24 werd het recombinant vaccinia virus, vP533, dat het β -galactosidasegen tot expressie brengt, op de volgende wijze verkregen: Een 1 Kb gebied binnen vaccinia HindIII fragment B overspannend de
- 10 SalI F/I verbinding van het Kopenhagen genoom bevat DNA homologie met het hemorrhagische (μ) gen van koepokkenvirus (188), zoals bepaald met Southern blot analysis (189). Het μ gen codeert een polypeptide met overeenkomst met serineproteaseremmers en is biologisch verantwoordelijk voor
- 15 hemorrhagische pokkenvorming door het virus op het chorio-allantoïsche membraan. De DNA volgorde van het Kopenhagen genoom laat zien dat het μ gen-equivalent veelvuldige frameshiftmutaties bevatte en biologisch niet functioneel was. Plasmide pSD419VC (184) (fig. 24) bevat het linker
- 20 gedeelte van het μ gebied. Plasmide pSD422VC, dat het Kopenhagen SalI fragment I gekloond in pUC8 bevat, bevat de rest van het μ gebied. Ter verwijdering van ongewenste vaccinia volgorden naar het linker gedeelte, werd pSD419VC gedigereerd met NcoI en SmaI, blunt-ended met het Klenow
- 25 fragment van E. coli polymerase en weer gekoppeld, hetgeen plasmide pSD476VC (fig. 24) gaf. Plasmide pSD422VC werd gedigereerd met HpaI en NruI en een ongeveer 0,3 Kb fragment onmiddellijk rechts van het μ gebied geplaatst werd geïsoleerd uit een agarosegel. Dit fragment werd gekoppeld
- 30 aan pSD476VC geknipt met HincII (dat SalI plaatsen herkent), hetgeen leidde tot plasmide pSD477VC. Teneinde β -galactosidase tot expressie te brengen onder controle van het Kopenhagen vaccinia μ promotor gebied, werden synthetische oligonucleotiden 22mer/20mer bereid. De volgorde van
- 35 22mer/20mer met de aangegeven restrictieplaatsen en het ATG initiatiecodon onderstreept is als volgt:

	<u>Cla</u> I	<u>Hpa</u> I	
22mer	5'	CGATTACTATGAAGGATCCGTT	3'
20mer	3'	TAATGATACTTCCTAGGCAA	5'.

- Het annealed 22mer/20mer mengsel werd gekoppeld
- 5 aan pSD477VC gedigereerd met ClaI en HincII, hetgeen leidde tot het nieuwe plasmide pSD479VC (fig. 24). Een 3,1 Kb BamHI fragment bevattende de E. coli β -galactosidase coderende volgorden uit pMC1871 (34) zonder initiatiecodon en promotor werd gekoppeld aan pSD479VC geknipt met BamHI.
- 10 Het verkregen plasmide dat het lacZ gen in de juiste oriëntatie onder controle van de Kopenhagen μ promotor bevatte werd aangeduid met pSD479VCBG. Dit invoegdonorplasmide werd gerecombineerd in vaccinia virus vP410 (184). Een recombinant vaccinia virus werd geïdentificeerd op basis
- 15 van blauwe plaque-vorming in aanwezigheid van het chromogene substraat X-gal (9, 24), plaque gekloond en aangeduid met vP533 (fig. 24).

- Ter vorming van een vectorplasmide voor het invoegen van vreemde genen, werden synthetische oligonucleotiden 42mer/40mer bereid.
- 20

	<u>Cla</u> I	<u>Bgl</u> II	<u>Sac</u> I	<u>Sma</u> I	<u>Xho</u> I	<u>Bam</u> HI	<u>Hpa</u> I
42mer	5'	CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGGATCCGTT	3'				
40mer	3'	TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCGAGCTCCCCTAGGCAA	5'.				

- Het annealed 42mer/40mer mengsel werd verknoopt met
- 25 pSD477VC geknipt met ClaI en HincII, hetgeen leidde tot het nieuwe plasmide pSD478VC (fig. 24). Dit plasmide bevat ongeveer 0,3 Kb vaccinia volgorden aan elke kant van het multiklonerende gebied dat volledig het μ coderende gebied van de Kopenhagen stam van vaccinia vervangt. pSD478VC werd
- 30 toegepast ter vorming van pPR24 (fig. 20) bevattende PRV gpIII coderende volgorden en vaccinia recombinanten vP604, vP644, vP691 en vP692.

- Onder verwijzing naar figuur 25 wordt opgemerkt dat plasmide pMP419 een 850 bp BamHI fragment uit vaccinia
- 35 HindIII fragment I bevattende de I3L promotor ingevoegd op de BamHI plaats van pUC8 (fig. 25) bevat. Het I3L promotor-element correspondeert met DNA volgorden stroomopwaarts van

het I3L open afleesframe in het vaccinia HindIII fragment I (187) en werd eerder toegepast voor het tot expressie brengen van vreemde genen in vaccinia virus recombinanten (27, 190). pMP419 werd lineair gemaakt op de unieke ClaI plaats in met I3L coderende volgorden en onderworpen aan Bal 31 digererings gevolgd door digererings met EcoRI en blunt-ending door behandeling met het Klenow fragment van E. coli polymerase. Het verkregen plasmide, pMP419-5, (fig. 25), bevat de I3L promotorvolgorden stroomopwaarts van nucleotide 8 gekoppeld aan een EcoRI plaats. Het promotor-element werd afgescheiden als een EcoRI-MspI fragment uit pMP419-5 en ingevoegd bij met EcoRI-ClaI gedigereerd pUC13C, een pUC13 derivaat bevattende een ClaI linker op de SmaI plaats. Het verkregen plasmide pMP13PP (fig. 22, 25) bevat de I3L promotorvolgorden van plaats -126 via plaats -8 gevolgd door een EcoRI plaats op plaats -8.

PRV gp50 aangezet door de vaccinia I3L promotor werd ingevoegd in de M2L deletie plasmidevector pMP409DVC (fig. 4), leidende tot pPR26 (fig. 22). pPR26 werd toegepast ter vorming van de vaccinia recombinanten vP591, vP621 en vP691 en vP692.

Isolatie van recombinant vaccinia virussen.

Recombinant vaccinia virussen die de PRV genen bevatten werden op de hiervoor beschreven wijze geïdentificeerd en gezuiverd. Recombinant vaccinia virussen die de drie PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 alleen of in combinatie tot expressie brengen, zijn vermeld in tabel 7.

Tabel 7: Benoeming van vaccinia virus recombinanten die de PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 tot expressie brengen.

	<u>Recombinant</u>	<u>Ouder</u>	<u>Donorplasmide</u>	<u>PRV glycoproteïnen</u>
5	vP534	vP425	pPR18	gII
	vP591	vP458	pPR26	gp50
	vP604	vP533	pPR24	gIII
	vP621	vP534	pPR26	gII + gp50
	vP644	vP604	pPR18	gII + gIII
10	vP691	vP604	pPR26	gIII + gp50
	vP692	vP644	pPR26	gII + gIII + gp50

15 In vitro beoordeling van de PRV glycoproteïnen tot expressie gebracht door vaccinia virus recombinanten.

De PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 zijn typische glycoproteïnen geassocieerd met de membraanachtige structuur van met PRV geïnfecteerde cellen en zijn bovendien bestanddelen van het virus. Anti-gpII, anti-gpIII en anti-gp50 specifieke, monoklonale antilichamen gevolgd door fluoresceïne geconjugeerde geit anti-muis IgG gaven een krachtige immunofluorescentie op het oppervlak bij cellen geïnfecteerd met de recombinant vaccinia virussen, doch niet bij met wildtype vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

25 In vivo beoordeling van het immunogene potentiaal van PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 tot expressie gebracht door vaccinia virus recombinanten in muizen en varkens.

30 Teneinde de relatieve immunogeniciteit van de drie PRV glycoproteïnen tot expressie gebracht door vaccinia virus recombinanten te bepalen, werden muizen in het voetbed ingeënt met 50 tot 100 μ l van verschillende doses van de recombinant virussen. 14 dagen na de immunisatie
35 werden de muizen geprovoceerd met 10 LD₅₀ van de virulente Kojnock stam van PRV via intraperitoneale weg. Volgens voorafgaande onderzoeken werd aangetoond dat elk van de

PRV glycoproteïnen doeltreffend te zijn bij het beschermen van ingeënte muizen tegen een virulente PRV provocatie. Volgens een uitgebreidere reeks onderzoeken waarbij gebruik gemaakt werd van meer dan 500 muizen, werd de werking van vaccinia recombinanten die PRV glycoproteïnen tot expressie brengen onderzocht. Berekend werd de vaccinatiedosis die in staat is 50 % van de geprovoceerde muizen te beschermen (PD_{50}) en de resultaten van deze onderzoeken zijn weergegeven in tabel 8. Recombinant vaccinia virus dat individueel PRV glycoproteïnen gpII, gp50 en gpIII tot expressie brengt geven berekende PD_{50} waarden van respectievelijk 6,4, 5,4 en 5,8 (\log_{10}). Werden de glycoproteïnen in combinatie tot expressie gebracht, dan werden de significant betere PD_{50} waarden berekend. De vaccinia recombinant die PRV gpII plus gp50 tot expressie brengt gaf een PD_{50} waarde van 3,3, terwijl de vaccinia recombinant die PRV gp50 plus gpIII tot expressie brengt een vrijwel overeenkomstige PD_{50} waarde (3,6) geeft. Duidelijk doeltreffender is de recombinant die de PRV glycoproteïnen gpII plus gpIII tot expressie brengt, waar een PD_{50} van 1,5 werd verkregen. Co-expressie van alle drie PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 in een recombinant vaccinia virus geeft geen PD_{50} -waarde die significant lager is dan die verkregen met de recombinant virussen die de drie PRV glycoproteïnen afzonderlijk tot expressie brengen. De gepotentieerde werking die met de vaccinia recombinant die gpII en gpIII tot expressie brengt vergeleken met het vaccinia recombinant virus dat de genen afzonderlijk tot expressie brengt is overeenkomstig aan de resultaten vermeld in tabel 6 voor de co-expressie van de paard herpesvirus glycoproteïnen gp13 en gp14.

Tabel 8: De werking van vaccinia virus recombinanten die de pseudorabies virus glycoproteïnen gp50, gpII en gpIII tot expressie brengt.

5	<u>Recombinant virus</u>	<u>PRV genen die tot expres- sie zijn gebracht</u>	<u>PD₅₀</u>
	vP534	gpII	6,4
	vP591	gp50	5,4
	vP604	gpIII	5,8
10	vP621	gpII + gp50	3,3
	vP644	gpII + gpIII	1,5
	vP691	gp50 + gpIII	3,6
	vP692	gp50 + gpII + gpIII	5,1

15

Hoewel de muis een interessant modelsysteem voor de beoordeling van PRV glycoproteïne immunogeniciteit kan geven, is het belangrijkste doelwitspecies van een PRV vaccin het varken. Daarom, teneinde de geldigheid van de recombinaant vaccinia virus aanpak bij varkens te beoorde-
 20 len, werd het volgende onderzoek uitgevoerd. Biggetjes met een gewicht van ongeveer 25 kg werden intramusculair ingeënt met 2 ml van de vaccinia recombinanten die combina-
 ties van de PRV glycoproteïnen gpII, gpIII en gp50 tot
 25 expressie brengen. Het virus-entstof werd verdund in PBS. Vijfendertig dagen na deze inënting werden de biggetjes geprovoceerd met een injectie in de neus (1 ml in elk neusgat) van een virulente PRV isolaat NIA3 suspensie. De doeltreffendheid van de vaccinatie werd beoordeeld door
 30 7 dagen na de provocatie de relatieve gewichtstoename van gevaccineerde en controle biggetjes te meten. De relatieve gewichtstoename wordt berekend als het dagelijkse, gemid-
 delde percentage gewichtstoename dat bij gevaccineerde biggetjes wordt waargenomen verminderd met het dagelijkse
 35 gemiddelde percentage gewichtstoename van niet-gevaccineerde controle biggetjes. De normale gewichtstoename van biggetjes onder ongestoorde omstandigheden is groter dan

1,1 kg. Zoals uit de waarden vermeld in tabel 9 blijkt, wordt de gewichtsontwikkeling gedurende de periode van 7 dagen na PRV provocatie in sterke mate bij de gevaccineerde biggetjes vergroot ten opzichte van de met wildtype virus ingeënte controle groep. Eén enkele inënting met de vaccinia virus recombinanten biedt een aanzienlijke bescherming tegen gewichtsverlies na virulente PRV provocatie.

Tabel 9: Beoordeling van vaccinia recombinanten die combinaties van de PRV glycoproteïnen gp50, gpII en gpIII in biggetjes tot expressie brengt.

Ent- virus	PVR genen die tot expressie zijn gebracht	Vaccinerende dosis <u>log₁₀ TCID₅₀/ml</u>	Relatieve gewicht- s- <u>toename</u>
15	vP452	geen	10 ^{7.7}
	vP621	gpII + gp50	10 ^{7.7}
	vP644	gpII + gpIII	10 ^{7.7}
	vP691	gp50 + gpIII	10 ^{7.3}
20	vP692	gp50 + gpII + gpIII	10 ^{7.3}

De beschikbaarheid van vaccinia virus recombinanten die de drie dominante PRV glycoproteïnen, afzonderlijk of in combinatie, tot expressie brengen, bieden een aantal voordelen ter bestrijding van PRV infecties: (a) een significant voordeel is dat de recombinant vaccinia virussen als vaccinerende middelen slechts een beperkt aantal PRV genen tot expressie brengen, waardoor er geen te verwachten risico van reversie van een verzwakte PRV vaccinstam tot een virulente vorm is en er geen voortgezette invoering van PRV virus in het milieu is, (b) aangezien slechts een beperkt aantal PRV antigenen door de vaccinia virus recombinant PRV vaccin kandidaten tot expressie wordt gebracht, maakt dit de discriminatie van gevaccineerde tegen natuurlijk geïnfecteerde dieren mogelijk, aangezien diagnostische reagentia die uit andere PRV antigenen be-

staan kunnen worden bereid ter verkrijging van een onderscheid tussen gevaccineerde en natuurlijk geïnfecteerde dieren, en (c) dergelijke recombinantvaccins bruikbaar kunnen zijn bij het verbreken van de natuurlijke, vertikale overdracht van PRV uit varkens naar het nakomelingschap. Dit kan geschieden door vaccinatie van de zwangere zeug met een vaccinia virus recombinant die een discreet stel PRV glycoproteïnen tot expressie brengt. Immuniteit via de moeder zal het nakomelingschap tegen PRV infectie beschermen. Daarna kan het nakomelingschap worden gevaccineerd met een vaccinia virus recombinant die nog een andere configuratie van PRV antigenen verschillend van die welke werden toegepast voor het vaccineren van de zeug tot expressie worden gebracht. Dit is een mogelijke weg om door de immuniteit van de moeder te breken. Een andere benadering om immuniteit via de moeder aan te pakken zal het tot expressie brengen van de PRV glycoproteïnen in welke combinatie dan ook in een volledig heterologe vector zijn. Dit kan worden uitgevoerd door de constructie van vogelpokkenvirus recombinanten die PRV glycoproteïnen tot expressie brengen. De bruikbaarheid van vogelpokkenvirus recombinanten waarvan het natuurlijke gastheertraject beperkt is tot vogelspecies, bij de vaccinatie van niet-vogelspecies, is aangetoond (41). Er zijn dus twee manieren om het aspect van de barrière verschaft door immuniteit van de moeder aan te pakken: (1) de vectoren en (2) de constellatie van de antigenen die door deze vectoren tot expressie zijn gebracht.

30 Voorbeeld 11

Vogelpokkenvectoren die het pseudorabies virus glycoproteïne gpII tot expressie brengen.

Men liet kanariepokkenvirus groeien op primaire kuikenembryofibroblasten (CEF) verkregen uit 10-11 dagen oude eieren met een embryo betrokken van SPAFAS, Inc. (Norwich, CT) onder de hiervoor beschreven omstandigheden (41, 42). Het virus werd gezuiverd van gastheercelveront-

reinigingen door sucrosegradiëntcentrifugatie onder toepassing van de methode beschreven door Joklik (191). Varkensnier (PK-1) cellen werden betrokken van de American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC #CL101).

5

Constructie van een kanariepokkenvirusrecombinant die het pseudorabiesvirus gpII glycoproteïne tot expressie brengt.

Onder verwijzing naar figuur 26, werd het plasmide pPR15 (fig. 18) toegepast als bron van het PRVgpII gen. Ter isolering van het DNA segment dat het volledige PRVgpII gen bevatte, werd pPR15 gedigereerd met EcoRV en HindIII. Een fragment van ongeveer 2,8 Kb bevattende 21 bp van het 3' uiteinde van de vaccina virus (VV) H6 promotor en het volledige PRVgpII gen werden bij deze digerering gevormd. Het 2,8 Kb EcoRV/HindIII fragment werd geïsoleerd voor invoeging in pFPCV2 (figuren 8, 26).

Het 2,8 Kb EcoRV/HindIII fragment (hiervoor gedefinieerd) werd ingevoegd in het 8,0 Kb pFPCV2 fragment verkregen door volledig digereeren met HindIII en partieel digereeren met EcoRV. Koppeling van deze twee fragmenten leidde tot de vorming van een 10,8 Kb plasmide aangeduid met pFPPRVII.

Onder verwijzing nu naar figuur 27, werd plasmide pFPPRVII toegepast voor de vorming van een 2,8 Kb NruI/HindIII fragment voor invoeging in pCPCV1 (fig. 9). Het pCPCV1 plasmide bevat de VV H6 promotor op de unieke EcoRI plaats in het 3,3 Kb PvuII CP genomische fragment. Dit invoegplasmide maakt het invoegen van vreemde genen op de C3 plaats van het CP genoom mogelijk. Het plasmide pCPCV1 werd gedigereerd met NruI en HindIII en het 5,8 Kb fragment werd geïsoleerd voor koppeling aan het hiervoor gedefinieerde 2,8 Kb fragment. Het verkregen plasmide werd aangeduid met pCPPRVII.

De dominante, selecteerbare merker E. coli xanthine-guanine fosforibosyltransferase (Eco gpt) werd ingevoegd in pCPPRVII als middel voor de groeiselectie van CP/PRVgpII

- recombinanten. Voorgaande publikaties hebben het gebruik van Eco gpt als een selecteerbare merker bij de vorming van pokkenvirusrecombinanten beschreven (193, 194). Het Eco gpt gen werd verkregen uit het plasmide pSV2gpt (ATCC #37145).
- 5 Het 670 bp BglII/DraI fragment, bevattende het Eco gpt gen, werd uit dit plasmide geïsoleerd en gebracht op de BglII/SmaI plaats van pSD486VC. Het verkregen plasmide, pGPT-1, bevat het Eco gpt gen tussen de VV μ gen flankerende armen en onder de transcriptionele regulering van de μ promotor.
- 10 Het plasmide pSD486VC werd op de volgende wijze verkregen uit pSD478VC (fig. 24). pSD478VC werd gedigereerd met EcoRI in het MCR, ingebracht met Klenow standaard reactie in aanwezigheid van dNTP (0,5 mM elk) en weer gekoppeld onder vorming van pSD478E VC. Dit plasmide werd gedigereerd met
- 15 HpaI en BamHI en annealed oligonucleotide HEM 5 (5'-GATCCGATTCTAGCT-3') en HEM 6 (5'-AGCTAGAATCG-3') werden ingevoegd ter verkrijging van pSD486VC.
- Door digeren van pGPT-1 met NcoI en EcoRI komt een 1,0 Kb fragment vrij dat het Eco gpt gen (670 bp) en de
- 20 VV μ promotor (330 bp) bevatte. De NcoI en EcoRI uiteinden werden blunted onder toepassing van het Klenow fragment van de E. coli DNA polymerase in aanwezigheid van 0,5 mM dNTPs. HindIII linkers (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD) werden toegevoegd aan het blunt-ended fragment. Het DNA
- 25 werd gedigereerd met HindIII en het 1,0 Kb fragment werd uit een agarosegel gewonnen. Dit 1,0 Kb HindIII fragment werd daarna ingevoegd op de HindIII plaats van pCPPRVII. Het verkregen plasmide bevattende de Eco gpt en PRVgpII genen gebonden in een staart tot staartconfiguratie werd
- 30 aangeduid met pCPPRVII gpt. Dit plasmide werd bij in vitro recombinatie-onderzoekingen toegepast voor invoegen op de C3 plaats van het CP genoom. Selectie van recombinanten die het Eco gpt gen bevatten werden uitgevoerd in aanwezigheid van 100 μ g/ml mycofenolisch zuur en de Eco gpt-positieve
- 35 recombinanten werden daarna onderzocht op de aanwezigheid van het PRVgpII gen door plaquehybridisatieanalyses. Eco gpt en PRV gpII positieve plaques werden gezuiverd door

- drie cycli van plaqueislatie en zuivere populaties liet men groeien tot een hoge titer en duidde ze aan met pCP55. Southern blot analyses bevestigde dat deze twee genen inderdaad genetisch in deze CP recombinanten waren gekoppeld. De CP recombinant werd aangeduid met vCP55.

Immunofluorescentie van met vCP55 geïnfecteerde cellen.

- Immunofluorescentie-onderzoekingen werden uitgevoerd ter demonstrering van de cellulaire lokalisatie van het tot expressie gebrachte PRV gpII in met vCP55 geïnfecteerde cellen. CEF of PK-1 cellen werden geënt op glazen dekplaatjes van 22 mm in schalen van 35 mm in een hoeveelheid van 5×10^5 cellen/schaal. CEF en PK-1 cellen werden geïnfecteerd met vCP55 of het CP parentale virus. Infecties en incubaties voor de immunofluorescentieproef werden uitgevoerd op de wijze zoals beschreven in voorbeeld 1, onder toepassing van het monoklonale antilichaam 75N10, 1 tot 100 verdund in PBS+.

- De geïnfecteerde cellen werden geanalyseerd voor zowel interne als oppervlakexpressie. Er werd geen significante oppervlakexpressie van gpII waargenomen in elk celsysteem dat met vCP55 was geïnfecteerd. Interne expressie van het gpII genproduct werd echter zowel in met vCP55 geïnfecteerde CEF cellen als PK-1 cellen aangetoond. De interne fluorescentiesignalen in beide celtypen werden gelokaliseerd in de korrels in het perinucleaire gebied van de geïnfecteerde cellen. Uit deze resultaten blijkt dat het PRVgpII tot expressie gebracht door CP wordt vervoerd naar het golgi complex doch niet naar het plasmamembraan. Dit resultaat verschilt van de resultaten van met vaccinia virus tot expressie gebracht gpII dat is gedetecteerd op het oppervlak van de geïnfecteerde cellen.

- #### Immunoprecipitatie van PRVgpII uit CEF en met PK-1 geïnfecteerde cellen.

Expressie van het PRVgpII genproduct door vCP55

werd geanalyseerd door immunoprecipitatie uit geïnfecteerde cellysaten. De celmonolagen werden geïnfecteerd met 5 PFU/cel. Het immunoprecipitatie-onderzoek werd uitgevoerd op de wijze als beschreven in voorbeeld 1, onder toepassing

5 van het monoklonale antilichaam 75N10.

De overheersende polypeptidespecies neergeslagen met konijn anti-PRV serum uit met CEF en PK-1 geïnfecteerde cellen migreerden met schijnbare molecuulgewichten van ongeveer 120 kDa, 67 kDa en 58 kDa. Deze polypeptiden geven

10 respectievelijk de voorloper en proteolytisch verwerkte vormen van het PRVgpII gedetecteerd in met PRV geïnfecteerde cellen waarvan via disulfidebindingen complexen zijn gevormd aan (86, 101, 196). Kleine species met schijnbare

15 molecuulgewichten van ongeveer 26 kDa werden eveneens waargenomen en kunnen verdere proteolytische verwerkingen van gpII in deze met CP/PRV recombinant geïnfecteerde cellen weergeven. Geen equivalente polypeptiden werden neergeslagen uit controle met CP virus geïnfecteerde cellen en niet-geïnfecteerde cellysaten.

20

Beschermingsonderzoekingen.

Het vermogen van VCP55 een beschermende immuunrespons tegen levende PRV provocatie op te wekken werd bij het muissysteem geanalyseerd. Muizen werden in het voetbed

25 ingeënt met 50 μ l tot 100 μ l monsters die verschillende doses vCP55 bevatten, zoals is weergegeven in tabel 10. Veertien dagen na de immunisatie ontvingen de muizen 16 LD₅₀ van de Kojnock stam van PRV via de intraperitoneale weg. Veertien dagen na de provocatie, op welk tijdstip het

30 onderzoek werd afgesloten, werden de overlevenden geteld. Zoals blijkt uit tabel 10 beschermde inënting van muizen met een enkelvoudige dosis van 10^{6.85} TCID₅₀ acht van de tien muizen tegen een letale provocatie van PRV. De onderzochte lagere doses van VCP55 boden geen enkele bescherming.

35 Provocatie met levend PRV veroorzaakte de dood van zeven van de acht niet-gevaccineerde muizen. Uit de resultaten vermeld in tabel 10 werd een PD50 (beschermende dosis voor

50 %) berekend van $10^{6.16}$ voor de vCP55 recombinant.

De werking van vCP55 als een immuniserend middel tegen provocatie met levend PRV werd eveneens onderzocht bij de doelwitspecies, het biggetje. Men verdeelde 15 biggetjes met een gewicht van bijna 25 kg in drie groepen. De vCP55 groep en de CP parentale virusgroep ontvingen elk twee inëntingen (2 ml gelijk aan 2×10^8 TCID₅₀), op de dagen 0 en 28, via de intramusculaire weg. Vijf biggetjes werden behouden als niet-gevaccineerde controles. Aan alle biggetjes werd de pathogene NIA3 stam van PRV via de intranasale route op dag 35 toegediend. De werking werd gevolgd door de gewichtsontwikkeling van met vCP55 gevaccineerde en controle biggetjes gedurende de zeven dagen na de provocatie te volgen. De gewichtsontwikkeling werd berekend als Delta GMQR waarden (in kilogram) = gemiddeld GMQR % gevaccineerde biggetjes - gemiddeld GMQR % niet gevaccineerde biggetjes.

In de niet-gevaccineerde groep bezweken alle biggetjes aan de PRV virusprovocatie (twee op dag 5, twee op dag 6 en één op dag 7). In de met wildtype virus (CP) ingeënte groepen bezweken vier van de vijf biggetjes aan de provocatie (drie op dag 6 en één op dag 7). Alle biggetjes in de met vCP55 gevaccineerde groep overleefden de PRV provocatie en gedijden.

De significante waarden van de bescherming van biggetjes ingeënt met vCP55 die het PRVgPII glycoproteïne tot expressie brengt tegen levende PRV provocatie werd onderzocht (tabel 11). Met vCP55 gevaccineerde dieren hadden een significante netto gewichtstoename gedurende de experimentele periode, terwijl de twee controlegroepen een significant gewichtsverlies gedurende de periode na de PRV provocatie vertoonden. Bovendien werden geen doodsgevallen in de met vCP55 gevaccineerde groep aangetroffen, terwijl een 80 % - 100 % mortaliteitsrate bij de controlegroepen na provocatie met levend PRV werd gevonden.

Tabel 10. Werking van vCP55 bij muizen.

	Dosis	Bescherming
	<u>log₁₀ TCID₅₀</u>	
5	6,85	8/10
	4,85	0/10
	2,80	0/10
	0,85	0/10

10

Tabel 11: Bescherming van gevaccineerde (vCP55) biggetjes tegen provocatie met PRV, zoals bepaald door het aantal doodsgeschiedenissen en gewichtsverlies.

15	<u>Behandeling</u>	<u>Mortaliteit</u>	<u>Gewichtstoename</u>
	Niet-gevaccineerd	5/5	-2,12
	Wildtype (CP)	4/5	+0,61
	Recombinant (vCP55)	0/5	+2,51

20

Voorbeeld 12

Vaccinia recombinanten die PRV gI glycoproteïnen tot expressie brengen.

Bij dit voorbeeld werden het Kopenhagen stam

25 vaccinia virus en daarvan afgeleide recombinanten toegepast.

Klonen van het PRVgI gen in kanariepokken en vaccinia virus donorplasmiden.

30 Onder verwijzing naar figuur 28, werd een plasmide pGPI bevattende het PRVgI gen (NIA3 stam) betrokken van Rhone Merieux, Lyon, Frankrijk. Het gI gen (volgordereferentie (80)) werd uit dit plasmide geïsoleerd en stroomafwaarts van de vaccinia synthetische H6 promotor gekloneerd

35 (69). Dit geschiedde door klonen van het 2,330 bp XhoI-NcoI (partieel) fragment van pGPI in het 6.400 bp XhoI-NcoI fragment van pGBC2. (pGBC2 werd gevormd door klonen van het

HSV2 gB gen in het 3.200 bp BglII fragment van pRW764.5. pRW764.5 werd gevormd door klonen van een 0,8 Kb PvuII fragment uit kanariepokken DNA in het 2.360 bp PvuI fragment van pUC18). Het bij deze manipulatie verkregen plasmide wordt met pPGI2 weergegeven.

Het initiëeringscodon van de H6 promotor werd daarna op één lijn gebracht met het initiëeringscodon van het gI gen. Dit geschiedde door klonen van de oligonucleotiden PRVL5

10 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCGGCCCTTTCTGCTGCGCGCCGCGCAGCTC-
3' en PRVL6 5'-
CTGCGCGCGCGCAGCAGAAAAGGGCCGATTACGATACAACTTAACGGAT-3', in
() het 5.900 bp EcoRV-AluNI (partieel) fragment van pPGI2. Het
bij deze manipulatie verkregen plasmide wordt met pPGI3
15 aangeduid.

Daarna werden vreemde PRV gI 3'-niet coderende volgorden geëlimineerd. Dit geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden, PRVL3 5'-
CTGGTTCGCGCATCCGGAGAAACCGGAAGTGACGA

20 ATGGGCCCAACTATGGCGTGACCGCCAGCCGCTGTGAATGCCCGCCCCGC-
TTAACTGC
AGAATTCCGATCCGAGCT-3' en PRVL4 5'-
CGGATCCGAATTCTGCAGTTAAGCGGGGC
GGGCATTCAACAGGCGGCTGGCGGTCACGCCATAGTTGGGCCCATTCGTCAC-
25 TTCCGGTT
TCTCCGGATCGCGGAACACAGCGT-3', in het 5.200 bp SacI-AatII
(partieel) fragment van pPGI3. Het bij deze manipulatie
ontwikkelde plasmide werd met pPGI6 aangeduid.

Het H6 promotor gI gen werd daarna gekloond in een
30 vaccinia virusdonorplasmide. Dit geschiedde door klonen van
het 1.750 bp NruI-BamHI fragment van pPGI6 in het 5.000 bp
NruI-BamHI fragment van pBP14. (pBP14 bevat het runder
leukemievirus gag gen onder de controle van de synthetische
vaccinia H6 promotor in het vaccinia vectorplasmide pSD494-
35 VC. pSD494VC is een sub-kloon van het Kopenhagen vaccinia
virus HindIII A fragment, waarin de coderende volgorde van
het vaccinia gen bevattende homologie met het koepokken ATI

gen (210) is vervangen door een polylinkergebied). Dit plaatst het H6 promoted gI gen tussen de vaccinia virus (Kopenhagen) volgorden flankerende het ATI gen. Het plasmide ontwikkeld door deze manipulatie wordt met pPGI7
5 aangeduid.

Het recombinant vaccinia virus vP717 werd verkregen door transfectie van pPGI7 in het vP410 geïnfecteerde cellen.

10 Constructie van vP717.

Het gI gen van PRV werd gekloond in een vaccinia virusvector. De strategie die werd toegepast voor het construeren van deze vaccinia virus recombinant vP717 is aangegeven in figuur 28. Het PRVgI gen in vP717 werd
15 gekloond tussen de vaccinia virusvolgorden die het ATI gen flankeren en maakt gebruik van de vaccinia virus vroeg-laet promotor H6 (41, 42, 69).

20 Immunofluorescentie van het door PRV gecodeerde polypeptide op met vP717 geïnfecteerde cellen.

In met PRV geïnfecteerde cellen wordt gI tot expressie gebracht op het plasmamembraan. Uit immunofluorescentieanalyses van met vP717 geïnfecteerde cellen met het voor PRV gI-specifieke monoklonale antilichaam, 42M17,
25 blijkt dat het door PRV gecodeerde polypeptide dat in deze cellen wordt gevormd eveneens op het plasmamembraan tot expressie is gebracht.

Beoordeling van vP717 bij muizen.

30 In vivo evaluatie van vP717 bij muizen wijst op enige bescherming tegen PRV provocatie (tabel 12), onder toepassing van standaardmethoden.

Tabel 12: Beoordeling van vaccinia virus recombinant vP717 dat PRV gpI bij muizen tot expressie brengt.

	vP717 inentingsdosis	Overleving bij PRV
5	<u>log₁₀ TCID₅₀</u>	<u>provocatie</u>
	7,3	4/10
	5,3	5/10
	3,3	0/10
	1,3	2/10
10	<hr/>	

Voorbeeld 13

Expressie van herpes simplex virus type 2 glycoproteïnen gB, gC en gD in vaccinia virus recombinanten, individueel of in combinaties.

HSV2 (stam G) (American Type Culture Collection, Bethesda, MD) (ATCC #VR734) die in dit voorbeeld werd toegepast werd gekweekt in VERO cellen (ATCC #CCL81) en gezuiverd door centrifugeren over een sucrosegradiënt (197).

Klonen van het HSV2 gB gen in vaccinia virus donorplasmiden.

De nucleotidevolgorde van het HSV2 gB gen is reeds eerder gepubliceerd (116). Onder verwijzing naar figuur 29 werd een 12 Kb EglII fragment bevattende het HSV2 gB gen geïsoleerd uit het HSV2 (stam G) genomisch DNA en ingevoegd bij de BamHI plaats van pUC19, onder vorming van het plasmide pJ4.

Het gB gen werd daarna gekloond tussen vaccinia virus (Kopenhagen) flankerende armen. Dit geschiedde door klonen van het 2.700 bp SstII-SacI (partieel) fragment van pJ4 in het SstII-SacII fragment van pMP409DVC3. (pMP409DVC3 is een derivaat van pMP409DVC (184) (fig. 4), waarin de EglII plaats is vervangen door een polylinkergebied). Dit plaatst het gB gen tussen de vacciniavolgorde die het M2L gen flankeren. Het volgens deze manipulatie gevormde

plasmide wordt met gGB1 aangeduid.

Daarna werd een in-frame terminatiecodon aan het 3' uiteinde van het gB gen toegevoegd. Dit geschiedde door klonen van de oligonucleotiden GBL3 5'-CTAATAG-3' en GBL4 5'-GATCCTATTAGAGCT-3' in het 6.300 bp BamHI-SacI (partieel) fragment van pGB1. Het door deze manipulatie gevormde plasmide werd met pGB2 aangeduid.

De H6 promotor werd daarna stroomopwaarts van het gB gen gekloond. Dit geschiedde door klonen van het 370 bp BglII fragment van pBLVH14 bevattende de H6 promotor op de BglII plaats van pGB2 (pBLVH14 bevat het door H6 promotede runder leukemie virus enveloppen in het vaccinia HA deletiegebied). Het door deletie gevormde plasmide wordt met pGB3 aangeduid.

Het initiatiecodon van de H6 promotor werd daarna op één lijn gebracht met de initiatiecodon van het gB gen. Dit geschiedde door klonen van de oligonucleotiden GBL1 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCGCGGGGGGGCTTGATTGCGCGCTGGTCGTG-GGGGCGCTGGTGGCCGC-3' en GBL2 5'-

GGCCACCAGCGCCCCACGACCAGCGCGCAAATCA AGCCCCCCCCGCGCATTACGATACAACTTAACGGAT-3', in het 6.300 bp SstII-EcoRV (partieel) fragment van pGB3. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt aangeduid met pGB5. In plasmide pGB5 is het HSV gB gen onder de controle van de vaccinia H6 promotor ingevoegd op de M2L deletieplaats van vaccinia. Aangezien de M2L invoegplaats aanwezig is in een groter gebied van het genoom dat kan worden deleted, werd het H6-promoted gB gen gekloond in een andere invoegplaats in een ander vaccinia virus donorplasmide. Dit geschiedde door klonen van het 2.800 bp BglII-BamHI fragment van pGB5 op de BglII plaats van pSD513VCVQ. (pSD513VCVQ is een subkloon van het Kopenhagen vaccinia virus HindIII J fragment waarin de coderende volgorde voor het thymidinekinase (TK) gen is vervangen door een polylinkergebied). Dit plaatst het H6-promoted gB gen tussen de vaccinia virusvolgorden die het TK gen flankeren. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pGB6 aangeduid.

Klonen van het HSV2 gC gen in vaccinia virus donorplasmiden.

- De nucleotidevolgorde van het HSV2 gC gen was reeds eerder bepaald (117). Onder verwijzing naar figuur 30, werd een 2.900 bp SalI fragment bevattende het HSV2 gC gen geïsoleerd uit HSV2 (stam G) genomisch DNA en ingevoegd op de SalI plaats van pIBI25 vormende het plasmide pGC3.

- Het gC gen werd daarna gekloond tussen vaccinia virus (Kopenhagen) flankerende armen. Dit geschiedde door klonen van het 2.900 bp XhoI-BamHI fragment van pGC3 op de XhoI-BamHI plaats van pGC2. pGC2 werd gevormd door klonen van het 370 bp BglII fragment van pBLVH14, bevattende de vaccinia virus H6 promotor op de BglII plaats van pSD486VC. pSD486VC is een sub-kloon van het Kopenhagen vaccinia virus HindIII B fragment, waarin de coderende volgorde van het μ gen is vervangen door een polylinkergebied. Dit plaatst het gC gen tussen de vaccinia virusvolgorde die het μ gen flankiert. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pGC5 aangeduid.

- Het initiatiecodon van de H6 promotor werd daarna op één lijn gebracht met het initiatiecodon van het gC gen. Dit geschiedde door klonen van de oligonucleotiden, GCL1 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCCCTTGGACGGGTGGGCCTAGCCGTGGG-CCTGTG-3' en GCL2 5'-AGGCCACGGCTAGGCCACCCCTCCAAGGGCCATTACGATACAACTTAACG-GAT-3' in het 5.4000 bp NruI-SfiI fragment van pGC5. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pGC10 aangeduid.

- De vreemde 3'-niet-coderende volgorde werd daarna uit pGC10 verwijderd. Dit geschiedde door weer ringvormig maken van het met E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) behandelde 4.900 bp SalI-SmaI (partieel) fragment van pGC10. Het volgens deze manipulatie verkregen plasmide wordt met pGC11 aangeduid.

- De extra 3'-niet coderende volgorde werd daarna uit pGC11 verwijderd. Dit geschiedde door kloneren van het oligonucleotide, GCL3 5'-CTAGGGCC-3' in het 4.900 bp XbaI-

ApaI (partieel) fragment van pGC11. Het door deze manipula-
tie verkregen plasmide wordt met pGC12 aangeduid. In
plasmide pGC12 is het HSV gC gen onder de controle van de
H6 promotor ingevoegd op de μ deletieplaats van vaccinia.
5 Aangezien de μ invoegingsplaats geplaatst is in een groter
gebied van het genoom dat kan worden weggedaan, werd het
H6-promoted gC gen daarna gekloneerd op de ATI invoegplaats
in een vaccinia virus donorplasmide. Dit geschiedde door
kloneren van het 1.550 bp NruI-BamHI fragment van pGC12 in
10 het 5.000 bp NruI-BamHI fragment van pBP14. Dit plaatst het
H6-promoted gC gen tussen de vaccinia virus (Kopenhagen)
volgorden flankerende het ATI gen. Het door deze manipula-
tie gevormde plasmide wordt met pGC13 aangeduid.

15 Kloneren van het HSV2 gD gen in vaccinia virus
donorplasmiden.

De nucleotidevolgorde voor het HSV2 gD gen was
reeds eerder bepaald (118). Onder verwijzing naar figuur 31
werd een 7,5 Kb XbaI fragment bevattende het HSV2 gD gen
20 geïsoleerd uit HSV2 (stam G) genomisch DNA en ingevoegd op
de XbaI plaats van pIBI25 onder vorming van het plasmide
pGD1.

Het gD gen werd daarna gekloneerd stroomafwaarts
van de H6 promotor en tussen de vaccinia virus (Kopenhagen)
25 flankerende armen. Dit geschiedde door kloneren van het
1.500 bp DraI-PstI fragment van pGD1 op de SmaI-PstI plaats
van pTP15 (184) (fig. 3). Dit plaatst het gD gen stroomaf-
waarts van de H6 promotor en tussen de vaccinia virusvolg-
orden die het HA gen flankeren. Het door deze manipulatie
30 gevormde plasmide wordt met pGD2 aangeduid.

Het initiatiecodon van de H6 promotor werd daarna
op één lijn gebracht met de initiatiecodon van het gD gen.
Dit geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden, GDL1
5'-ATCCGTTAAGTTTGATCGTAATGGGGCGTTTGACCTCCGG-3' en GDL2 5'-
35 CGCGGAGGTCAAACGCCCCATTACGATACAACTTAACGGAT-3', in het
5.100 bp EcoRV-AhaII (partieel) fragment van pGD2. Het door
deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pGD5 aange-

duid.

De vreemde 3'-niet coderende volgorde werd daarna verwijderd. Dit geschiedde door klonering van de oligonucleotiden GDL3 5'-GGCAG-

- 5 TACCCTGGCGGCGCTGGTCATCGGCGGTATTGCGTTTTGGGTACGCCGCCGGCGC
TCAGTGGCCCCCAAGCGCCTACGTCTCCCCCACATCCGGGATGACGACGCGCCCC-
CCTCGCACCAGCCATTGTTTTACTAGCTGCA-3' en GDL4 5'-GCTAGTAAAA-
CAATGGCTGGTGCAGAGGGGGCGCGTCTCATCCCGGATGTGGGGAGACGTAGGC-
GCTTGGGGGCCACTGAGCGCCGGCGGTACCCAAAACGCAATACCGCCGATGACC-
10 AGCGCCGCCAGGGTACTGCC-3', in het 4.800 bp NaeI-PstI fragment
van pGD5. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt
met pGD7 aangeduid.

- Een extra volgorde werd daarna 5' ten opzichte van
de H6 promotor toegevoegd. Dit geschiedde door klonering
15 van het 150 bp BglII-EcoRV fragment van pGB6 (fig. 30) in
het 4.800 bp BglII-EcoRV fragment van pGD7. Het door deze
manipulatie gevormde plasmide wordt met pGD8 aangeduid.

Constructie van recombinant vaccinia virussen.

- 20 De strategie die werd toegepast voor het kloneren
van de HSV2 gB, gC en gD genen in vaccinia virus is toege-
licht in respectievelijk de figuren 29, 30 en 31. Bij alle
constructies wordt gebruik gemaakt van de vaccinia virus
vroeg-laag promotor, H6 (41, 42, 184). Elk HSV2 gen wordt
25 echter op een verschillende plaats in het vaccinia virus
genoom gekloneerd. Het H6-promoted gB gen wordt gekloneerd
tussen de volgorde die het M2L gen (vP569) flankiert of de
volgorde die het TK gen (vP734, vP775 en vP776) flankiert.
Het H6-promoted gC gen wordt gekloneerd tussen de volgorde
30 die een μ gen (vP579) flankiert of de volgorde die het ATI
gen 8vP748, vP776 en vP777) flankiert. Het H6-promoted gD
gen wordt gekloneerd tussen de volgorde die het HA gen
(vP570, vP761, vP775 en vP777) flankiert. Het recombinant
vaccinia virus vP569 werd verkregen door transfectie van
35 pGB5 in met vP458 geïnfecteerde cellen. vP734 werd gevormd
door transfectie van pGB6 in met vP618 geïnfecteerde
cellen. vP579 werd verkregen door transfectie van pGC11 in

- met vP533 geïnfecteerde cellen. vP748 werd gevormd door transfectie van pGC13 in met vP618 geïnfecteerde cellen. vP570 werd verkregen door transfectie van pGD5 in met vP425 geïnfecteerde cellen. vP761 werd verkregen door transfectie van pGD8 in met vP618 geïnfecteerde cellen.

- VP425 is een variant van het wildtype vaccinia virus (Kopenhagen) waaruit het TK gen is deleted en het HA gen is vervangen door β -galactosidase (voorbeeld 1) (184). vP458 is een variant van het wildtype vaccinia virus waaruit het TK gen is deleted en het M2L gen is vervangen door β -galactosidase (voorbeeld 2). vP533 is een variant van het wildtype vaccinia virus waaruit het TK gen is deleted en het μ gen is vervangen door β -galactosidase. vP618 is een variant van het wildtype vaccinia virus waaruit TK, μ en ATI genen is verwijderd.

- Eveneens werden recombinant vaccinia virus bevattende twee HSV2 glycoproteïne genen geconstrueerd. vP775 bevat de gB en gD genen, vP776 bevat de gB en gC genen en vP777 bevat de gC en gD genen. vP775 werd gevormd door transfectie van pGD8 in met vP734 geïnfecteerde cellen. vP776 werd verkregen door transfectie van pGC13 in met vP734 geïnfecteerde cellen. vP777 werd verkregen door transfectie van pGD8 in met vP748 geïnfecteerde cellen.

- Eveneens werd een recombinant vaccinia virus dat drie HSV2 glycoproteïne genen bevat geconstrueerd. vP812 bevat de gB, gC en gD genen van HSV-2. vP812 werd gevormd door transfectie van pGD8 in met vP776 geïnfecteerde cellen.

Immunofluorescentie van HSV2 glycoproteïnen in met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

- In met HSV2 geïnfecteerde cellen, werden gB, gC en gD (evenals andere door HSV2 gecodeerde glycoproteïnen) tot expressie gebracht op het plasmamembraan. Immunofluorescentie-onderzoekingen uitgevoerd op cellen geïnfecteerd met de recombinant vaccinia virussen die HSV2 bevatten genen geven aan dat de HSV2 polypeptiden die in de cellen geïnfecteerd

met deze recombinant vaccinia virussen worden gevormd eveneens op het plasmamembraan tot expressie worden gebracht.

5 Immunoprecipitatie van HSV2 glycoproteïnen in met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

Het HSV2 gB glycoproteïne gevormd in met HSV2 geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van ongeveer 117 kDa (198, 199). Cellen die met recombinant vaccinia virussen bevattende het HSV2 gB gen (vP569, vP734, vP775 en vP776) zijn geïnfecteerd bevatten vormen eveneens een door HSV2 gecodeerd polypeptide met een molecuulgewicht van ongeveer 117 kDa. Immunoprecipitatie van met vP569 geïnfecteerde cellen met antisera voor volledig HSV2 virus slaat twee belangrijke eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 117 kDa en 110 kDa en drie minder belangrijke eiwitten met molecuulgewichten van 50 kDa, 45 kDa en 30 kDa neer. Immunoprecipitatie van met vP734, vP775 en vP776 geïnfecteerde cellen slaat twee belangrijke eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 110 kDa en 90 kDa en vijf minder belangrijke eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 117 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 45 kDa en 30 kDa neer.

Het HSV2 gC glycoproteïne geproduceerd in met HSV2 geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van ongeveer 63 kDa (199, 200). Cellen die met recombinant vaccinia virussen bevattende het HSV2 gC (vP579, vP748, vP776 en vP777) zijn geïnfecteerd vormen eveneens een door HSV2 gecodeerd polypeptide met een molecuulgewicht van ongeveer 63 kDa. Immunoprecipitatie van met vP579, vP748, vP776 en vP777 geïnfecteerde cellen met antisera voor volledig HSV2 virus slaat een belangrijk eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 65 kDa en een minder belangrijk eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 85 kDa neer. Konijn antisera tegen volledig HSV2 virus werd verkregen van DAKO Corporation (Santa Barbara, CA; code no. B116) en werd in een verdunning van 1:100 gebruikt.

Het HSV2 gD glycoproteïne gevormd in met HSV2

geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van ongeveer 51 kDa (198, 199). Cellen geïnfecteerd met recombinant vaccinia virussen die het HSV2 gD gen (vP570, vP761, vP775 en vP777) bevatten vormen eveneens een door HSV2 gecodeerd polypeptide met een molecuulgewicht van ongeveer 51 kDa. Immunoprecipitatie van met vP570, vP761, vP775 en vP777 geïnfecteerde cellen met antisera voor het volledige HSV2 virus slaat een belangrijk eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 48 kDa en twee minder belangrijke eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 40 kDa en 31 kDa neer.

In vivo beoordeling.

Alle recombinant vaccinia virussen die de verschillende constructies van HSV2 glycoproteïnen tot expressie brengen beschermen geïmmuniseerde muizen tegen daarna plaats vindende letale HSV provocatie bij onderzoekingen die analoog waren aan die beschreven door Paoletti en med. (26).

Voorbeeld 14

Expressie van het runder herpesvirus 1 glycoproteïne gI in vaccinia virus recombinanten.

Kloneren van het BHV1 gI gen in vaccinia virus donorplasmiden.

De nucleotidevolgorde van het BHV1 gI gen is reeds eerder gepubliceerd (63). Onder verwijzing naar figuur 32 werd een plasmide pIBRS6 bevattende het BHV1 gI gen (Straub stam) betrokken van Rhone Merieux, Lyon, Frankrijk. Het 5' uiteinde van het gI gen werd stroomafwaarts van de H6 promotor (41, 42, 69) en tussen vaccinia virus (Kopenhagen) flankerende armen gekloneerd. Dit geschiedde door kloneren van het 540 bp SalI-PstI fragment van pIBRS6 in het 4.400 bp SalI-PstI fragment van pGD5 (pGD5 werd verkregen door kloneren van het HSV2 gD gen in pTP15 (184) (fig. 3). Dit plaatst het gI gen stroomafwaarts van de H6 promotor en tussen de vaccinia virus HA flankerende armen. Het plasmide verkregen door deze manipulatie wordt met pIBR2 aangeduid.

Het initiatiecodon van de H6 promotor werd daarna op één lijn gebracht met het initiatiecodon van het gI gen. Dit geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden,

IBRL1 5'-

- 5 ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCCGCTCGCGGCGTGCTGAACGCGCCGC-3' en
IBRL2 5'-
GGCGCGTTCAGACCCGCGCGAGCGCCATTACGATACAACTTAACGGAT-3' in
het 3.800 bp NruI-SstII fragment van pIBR2. Het plasmide
dat door deze manipulatie wordt verkregen wordt met pIBR4

10 aangeduid.

Een NcoI plaats, benodigd door toekomstige manipulaties, werd daarna gevormd. Dit geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden IBRL3 5'-CCATGGTTAATGCA-3' en IBRL4 5'-TTAAACCATGGTGCA-3' op de PstI plaats van pIBR4.

- 15 Het door deze manipulatie verkregen plasmide wordt met pIBR5 aangeduid.

Het 3'-uiteinde van het gI gen werd daarna geklooneerd in pIBR5. Dit geschiedde door kloneren van het 1.740 bp Tth111I-NcoI fragment van pIBR6 in het 3.700 bp

- 20 Tth111I-NcoI fragment van pIBR5. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pIBR7 aangeduid.

Daarna werd een BglII plaats benodigd voor toekomstige manipulaties gevormd. Dit geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden IBRL5 5'-CATGGTTAAGATCTC-3' en

- 25 IBRL6 5'-CATGGAGATCTTAAAC-3' op de NcoI plaats van pIBR7. Het door deze manipulatie verkregen plasmide wordt met pIBR8 aangeduid.

Een gedeelte van de lange hydrofiële aanloopsequentie van het gI gen werd daarna deleted (63). Dit

- 30 geschiedde door kloneren van de oligonucleotiden, IBRL7 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCCGCGCTAGCCGCTGCCCTGCTATGGGCGA-CGTGGGCC-3' en IBRL8 5'-

CACGTCGCCCATAGCAGGGCAGCGCTAGCGCGCCATTACGATACAACTTAACGAT-3' in het 4.400 bp NruI-ApaI (partieel) fragment van

- 35 pIBR8. Dit elimineert 132 bp van het hydrofielische aanloopsequentie. Het door deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pIBR9 aangeduid.

Daarna werd het H6 promoted truncated gI gen gekloneerd in een ander vaccinia virus donorplasmide. Dit geschiedde door kloneren van het 1.700 bp NruI-BglII fragment van pIBR9 in het 4.900 bp NruI-BamHI fragment van pBP14 (211). Het bij deze manipulatie gevormde plasmide wordt met pIBR10 aangeduid.

Constructie van recombinant vaccinia virussen.

De strategie die wordt toegepast voor het kloneren van het BHV1 gI gen in vaccinia virus is beschreven in figuur 32. Het recombinant vaccinia virus vP637 werd verkregen door transfectie van pIBR7 in met vP410 geïnfecteerde cellen. vP724 werd verkregen door transfectie van pIBR10 in met vP410 geïnfecteerde cellen. vP637 bevat het volledige BHV1 gI gen. vP724 bevat een gI gen deleted van 132 bp van 5' signaalvolgorde (63). Beide constructies maken gebruik van de vaccinia virus vroeg-laag promotor H6 (41, 42, 184). Het gI gen in vP637 wordt gekloneerd tussen de volgorden die het HA gen flankeren. Het gI gen in vP724 wordt gekloneerd tussen de volgorden die het ATI gen flankeren.

Immunofluorescentie en detectie van een door BHV1 gecodeerd polypeptide in met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

In met BHV1 geïnfecteerde cellen wordt gI tot expressie gebracht op het plasmamembraan. Uit immunofluorescentie-onderzoekingen van cellen die met vP637 of vP724 waren geïnfecteerd blijkt dat het door BHV1 gecodeerde polypeptide dat in deze cellen wordt gevormd eveneens op het plasmamembraan tot expressie wordt gebracht. De immunofluorescentie werd uitgevoerd op de wijze als beschreven in voorbeeld 1. Gebruik gemaakt werd van de BHV1 gI-specifieke, monoklonale antilichamen 4203 en 5106 (201).

Voorbeeld 15

Expressie van kat herpesvirus glycoproteïne gB in een vaccinia virus recombinant.

- 5 De WR stam van vaccinia virus (202) werd in dit voorbeeld toegepast. Het van de WR stam afgeleide recombinant vaccinia virus vP293 werd toegepast als reddend virus (69).

Extractie van FHV-1 DNA en kloneren van het FHV-1

10 SacI-SacI 3,2 Kb fragment.

- FHV-1 DNA werd geëxtraheerd en gezuiverd uit de CO stam. Het FHV-1 DNA genoom werd gedigereerd met EcoRI en gekoppeld in het plasmide pBR322 onder toepassing van standaard methoden (20). Deze FHV-1 bank werd onderzocht met DNA probes verkregen uit de PRVhII (62) en BHV-1 gB (203) genen. Daaropvolgende hybridisaties met sub-klonen verkregen uit de twee EcoRI klonen die door hybridisatie positief werden bevonden maakt een duidelijker in kaart brengen van het FHV-1 gB gen mogelijk. Een 3,2 Kb SacI-SacI fragment bevattende het FHV-1 gB gen werd gekloneerd in pUC18, onder vorming van het plasmide pFHVgBC.
- 20

Sequencing van het SacI-SacI fragment coderende voor FHV-1-gB.

- 25 Nucleotide sequencewaarden werden voor beide strengen verkregen uit van pFHVgBC en pFHVgBC afgeleide sub-klonen onder toepassing van gemodificeerd T7 Sequenase, zoals hiervoor is beschreven.

30 Kloneren van het FHV-1 gB gen in een vaccinia virus donorplasmide.

- Onder verwijzing naar figuur 33 werd het FHV-1 gB gen gekloneerd in pHES4, één van de plasmiden ontworpen voor het gastheertraject-selectiesysteem WR in de vaccinia virus stam (69) (fig. 10). Dit plasmide bevat het gastheertraject-gen K1L, dat het deletiemutant vP293 mogelijk maakt op humane cellen te repliceren. Het FHV-1 gB gen
- 35

werd onmiddellijk stroomafwaarts van de vaccinia synthetische H6 promotor ingevoegd (69). Het plasmide pFHVgBC werd gedigereerd met KpnI en SacI en het 3150 bp restrictiefragment bevattende FHV-1 gB werd geïsoleerd uit een agarosegel en daarna gekoppeld aan plasmide pHES4 dat eerder was gedigereerd met KpnI en SacI. Het verkregen plasmide werd met pJCA001 (fig. 33) aangeduid.

DNA sequence analyse van het FHV-1 gB gen.

Onder verwijzing naar figuur 34 blijkt uit DNA sequence analyse een open afleesframe dat zich uitstrekt van de nucleotideplaatsen 337 tot 3177. Veronderstelde transcriptionale regelende signalen werden aangetroffen in het 5' gebied ten opzichte van de ATG initiatiecodon op plaats 337. Een TATA box met de volgorde AAATATAT (nucleotiden 184-191) was 80 nucleotiden stroomafwaarts van een vermoedelijke CAT box met de volgorde GGTGAGTA geplaatst. Een polyadenyleringssignaal AATAAA (nucleotiden 3251 tot 3256) was 50 nucleotiden stroomafwaarts van de TAA terminatiecodon (nucleotiden 3178 - 3180) geplaatst. Acht van de elf nucleotiden in de volgorde 5' TCATTCTAGCA 3' (de nucleotiden 200 - 210) zijn complementair aan de 18S ribosomale RNA volgorde 3' AGGAAGGCGT 5' (61) en kunnen dienen als de ribosoombindingsplaats. Een scannend model werd voorgesteld waarmee de eukaryotische mRNA's translatie initiëren (151, 155). De volgordecontext rondom het voorgestelde initiatiecodon ATCATGT (nucleotiden 334 tot 340) kwalificeert als een functionele volgordecontext voor de translatie-initiatie van eukaryotisch mRNA. Het FHV-1 gB open afleesframe codeert voor 947 aminozuren met een berekend molecuulgewicht van 106,2 kDa. Het G + C gehalte bedraagt 45,8 %.

Analyse van de FHV-1 gB eiwitstructuur.

Analyse van het aminozuurvolgorde levert een aantal aspecten op die gewoon voor met membraan geassocieerde glycoproteïnen zijn. Een gebied dat zich uitstrekt van de aminozuren 23 tot 73 had een kenmerkend hydrofobiciteitsprofiel.

teitsprofiel en wordt voorgesteld als signaalvolgorde (figuur 34). Onder verwijzing naar figuur 35 wordt opgemerkt dat er een 22 aminozuren lange hydrofiele volgorde voorafgaande aan de lange hydrofobe signaalvolgorde is. Dit kenmerk werd eveneens opgemerkt voor het pseudorabies (PRV) gII gen (62), voor het runder herpesvirus-1 (BHV-1) gI gen (63) en voor de paard herpesvirus-1 (EHV-1) (71) en paard herpesvirus-4 (EHV-4) (72) gpl4 genen, die alle eveneens HSV gB homologen zijn. Voorspeld is dat een hydrofoob gebied dat bestaat uit 42 aminozuren (de aminozuren 789 - 831) functioneren als een transmembraan-ankergebied. Het hydrofiele cytoplasmische gebied bevat 116 aminozuren. Er zijn tien Asn-X-Thr/Ser plaatsen (waarin X elk aminozuur, behalve proline kan zijn) voor potentiële, met N-gebonden glycosylering (64), waarbij één plaats in de signaalvolgorde aanwezig is. Er zijn twee opeenvolgende en wat potentiaal betreft dicht bij elkaar liggende, proteolytische splitsingsplaatsen (Arg-Arg-Ser) (de plaatsen 504 - 506 en 516 - 518) identiek met die aanwezig in PRVgII (94), VZV gPII en HCMV gB (71) en EHV-1 gpl4 (71, 72). Het hydrofobiciteitsprofiel van de FHV-1 gB aminozuurvolgorde is weergegeven in figuur 35.

25 Vergelijking van de FHV-1 gB aminozuurvolgorde met andere herpesvirus glycoproteïnen.

Vergelijking van de aminozuursamenstelling van het FHV-1 gB gen vertoont een uitgebreide homologie met glycoproteïnen van andere herpesvirussen. Zo is het FHV-1 gB homoloog aan PRVgII (62), BHV-1 gI (63), varicella zoster virus (VZV) gII (66, 204), HSV-1 gB (68), HSV-2 gB (205), EHV-1 gpl4 (71), evenals met glycoproteïnen in Epstein-Barr virus (EBV) (68, 206) en humaan cytomegalovirus (HCMV) (10).

35 Constructie van de vaccinia recombinant vP713 die het FHV-1 gB glycoproteïne tot expressie brengt.

De FHV-1 gB coderende volgorden werden ingevoegd

in een vaccinia virus vector onder toepassing van het WR vaccinia virus gastheertraject-selectiesysteem pHES4/vP293 (69). Het vermogen van recombinant vaccinia nakomelingschap ontwikkeld door recombinatie onder toepassing van het WR
5 vaccinia virus vP293/pHES gastheertraject-selectiesysteem om een plaque te vormen op humane MRC-5 cellen maakt een snelle identificatie van deze recombinanten (69) mogelijk. Vaccinia virus recombinant vP713 werd verkregen door recombinatie uitgevoerd met plasmide pJCA001 als donorplas-
10 mide en vP293 als reddend virus (fig. 33).

Immunofluorescentie van FHV-1 gB glycoproteïne
gesynthetiseerd door vP713.

Immunofluorescentie van met recombinant vaccinia
15 virus vP713 geïnfecteerde VERO en MRC-5 cellen werd uitge-
voerd op de wijze als beschreven in voorbeeld 1, onder
toepassing van anti-FHV-1 gB specifiek schaapserum #2854. Een multipliciteit van infectie van twee pfu per cel werd
toegepast. FITC ezel anti-schaap IgG werd toegepast als het
20 tweede antilichaam.

FHV-1 gB kon worden aangetoond op het oppervlak
van VERO cellen geïnfecteerd met vaccinia recombinant vP713
evenals inwendig na acetonfixatie. Geen significante
inwendige of oppervlak immunoreactiviteit ten opzichte van
25 FHV-1 gB werd gevonden bij met vP410 geïnfecteerde controle
cellen.

Immunoprecipitatie van FHV-1 gB glycoproteïne
gesynthetiseerd door vP713.

Teneinde het FHV-1 gB glycoproteïne tot expressie
30 gebracht door vP713 te beoordelen, werden VERO cellen
geïnfecteerd met vP713 en eiwitten werden metabolisch
gelabeld met ³⁵S methionine. Immunoprecipitaties werden
uitgevoerd met de geradiolabelde cellysaten onder toepas-
35 sing van anti-FHV-1 gB specifiek schaapserum #2854.

VERO cel monolagen geënt met 2×10^6 cellen per
schalen van 60 mm werden geïnfecteerd met een lage multi-

pliciteit van infectie van 0,1 pfu per cel met controle (vP410) of recombinant vaccinia virus vP713. De immunoprecipitaties werden uitgevoerd op de wijze als beschreven in voorbeeld 1.

- 5 Geen significante produkten werden geimmunoprecipiteerd door het specifieke anti-FHV-1 gB serum uit zowel niet-geïnfecteerde VERO cellen of VERO cellen geïnfecteerd met het controle vaccinia virus vP410. FHV-1 gB geradiolabelde produkten werden neergeslagen met serum #2854 uit
- 10 VERO cellen geïnfecteerd met vP713. Vijf dominante, meta-
- 15 bolisch geradiolabelde polypeptiden werden specifiek neergeslagen. De twee grotere polypeptiden met de schijnbare moleculaire afmetingen 115 kDa en 110 kDa konden overeenkomen met de niet-geglycosyleerde voorloper en rijpe eiwitten (theoretische afmetingen van respectievelijk 106 kDa en 98 kDa). Een grote band bij 68 kDa kan de twee geglycosyleerde onder-eenheden (69 kDa + 66 kDa), het gevolg van de proteolytische splitsing van een geglycosyleerde voorloper (136 kDa), die hier ontbreekt, aangeven. Drie kleinere neergeslagen produkten (59, 53 en 48 kDa) komen niet overeen met
- 20 een van de bekende FHV-1 gB produkten en kunnen ontledingsprodukten weergeven.

Voorbeeld 16

- 25 Kloneren en tot expressie brengen van het Epstein-Barr virus glycoproteïne in pokkenvirusvectoren.

Kloneren van de EBV gp340 en gp220 genen in het vaccinia donorplasmide pMP409DVC.

- 30 In dit voorbeeld werden de EBV genen geïsoleerd uit de B95-8 EBV stam (207), waren de gp340 en gp220 genen cDNA klonen (respectievelijk de plasmiden pMLPgp340 en pMLPgp220) en waren de gB, gH en BBRF3 genen geïsoleerd uit een BamHI genenbank. Onder verwijzing naar figuur 36 werd een 2100 bp XmaI-ClaI fragment van het pMLPgp220 plasmide
- 35 gekloneerd in M13mp18 gedigereerd met XmaI-AccI. De door deze manipulatie verkregen faag werd aangeduid met mp18gp-220 (figuur 36). Door in vitro mutagenese (17) onder

toepassing van de oligonucleotiden CM4
(TAAAGTCAATAAAATTTTATTGCGGCCGCTACCGAGCTCGAATTCG) en CM5
(GCTTGCATGCCTGCAGATATCCGTTAAGTTGTATCGTAATGGAGGCAGCCTTGC)
werd het gp220 gen gemodificeerd om tot expressie te worden
5 gebracht onder controle van de vaccinia H6 promotor. Het
plasmide dat het gemodificeerde gp220 gen bevatte werd
aangeduid met mp18gp220(5+4) (fig. 36).

Het gemodificeerde gp220 gen werd gekloneerd in
het plasmide SP131NotI, dat de volledige H6 synthetische
10 promotor (69) bevat. Dit geschiedde door kloneren van het
2300 bp NarI-EcoRV fragment van mp18gp220(5+4) in het 294/
bp EcoRV-NarI fragment van het SP131NotI plasmide. Het
verkregen plasmide werd met SP131gp220 (fig. 36) aangeduid.

Het gp340 gen onder de controle van de H6 promotor
15 werd verkregen door kloneren van een 2360 bp ScaI-ShoI
fragment van pMLPgp340 in het XhoI-ScaI (partieel) gedige-
reerde SP131gp220 plasmide. Het verkregen plasmide werd
aangeduid met SP131gp340 (fig. 36).

De door H6 promoted gp340 en gp220 genen werden
20 gekloneerd in het vaccinia virus M2L invoegplaatsplasmide
pMP409DVC (fig. 4; in figuur 36, 40, dit plasmide wordt
aangegeven door MP409). Dit geschiedde door kloneren van
het met 2800 bp Mung-Bean nuclease behandelde NotI fragment
van het plasmide SP131gp340 en het met 2100 bp Mung-Bean
25 nuclease behandelde NotI fragment van het plasmide SP131gp-
220 in de met BglII Mung-Bean nuclease behandelde plaats
van het plasmide pMP409DVC. De verkregen plasmiden werden
respectievelijk aangeduid met 409H6340 en 409H6220 (figuur
36).

30

Kloneren van het EBV gB gen in het vaccinia virus
donorplasmide pMP409DVC.

Onder verwijzing nu naar figuur 37, werd een 3500
bp EcoRI-XmnI fragment van het EBV DNA BamHI A fragment
35 (207), bevattende het EBV gB gen, geïsoleerd uit de EBV
genoombibliotheek en gekloneerd in het 2837 bp HincII-EcoRI
fragment van pIBI25. Het verkregen plasmide werd aangeduid

met p25gB (figuur 37).

Door in vitro mutagenese (17, 185) werd, onder toepassing van de oligonucleotiden EBVBM5

(CCCTACGCCGAGTCATTACGATACAAACTTAACGGATATCAGAGTCGTACGTAGG) en EBVBM3

(CTGGAACACACTTGGGAATTCAAGCTTCATAAAAAGGGTTATAGAAGAGTCC), het gB gen aangepast om onder de controle van de vaccinia H6 promotor tot expressie te worden gebracht. Het verkregen plasmide werd aangeduid met p25gB(5+3).

Het 2600 bp EcoRV-EcoRI fragment van p25gB(5+3) werd gekloneerd in het 3300 bp EcoRV-EcoRI fragment van SP131. Het verkregen plasmide werd aangeduid met SP131gB (fig. 37).

Het H6 promotor gB gen werd daarna gekloneerd in het vaccinia virus donorplasmide pMP409DVC. Dit geschiedde door kloneren van het met 2700 bp HindIII Mung-Bean nuclea-se behandelde fragment van SP131gB in de met BglII Mung-Bean-nuclease behandelde plaats van pMP409DVC. Het verkregen plasmide werd aangeduid met 409H6gB (fig. 37).

Kloneren van het EBV gH gen in het vaccinia donor-plasmide pSD486VC.

In de met EBV BamHI gekloneerde restrictiefragmentenbibliotheek, is het open afleesframe BXLf2 aanwezig in de BamHI X en BamHI T fragmenten (207). Zoals uit figuur 38 blijkt, werd het volledige BXLf2 open afleesframe gereconstitueerd door kloneren van het 830 bp SmaI-BamHI fragment van BamHI X in het 2880 bp SmaI-BamHI fragment van pIBI24; het verkregen plasmide werd aangeduid met 24gH5. Het 1850 bp BamHI-HindIII fragment van BamHI T werd gekloneerd in het 3660 bp BamHI-HindIII fragment van 24gH5. Het verkregen plasmide bevattende het volledige gH gen werd aangeduid met 24gH (fig. 38).

Door in vitro mutagenese (17, 185) onder toepassing van de oligonucleotiden

HM5 (ACACAGAGCAACTGCAGATCTCCCGATTTCCTCT),

HM4 (GGGCAAAGCCACAAAATATGCAGGATTTCTGCG) en HM3

(GCCAGGGTTTTCCAGAGATCTGATAAAAAACGACGCCAGTG), werd het gH gen gemodificeerd om tot expressie te worden gebracht onder de controle van de vaccinia hemorrhagisch (μ) vroege promotor. Het oligonucleotide HM4 werd toegepast ter verwijdering van een vaccinia vroeg transcriptie-stopsignaal aanwezig in het gH gen (45). Het plasmide dat het gemodificeerde gH gen bevatte werd aangeduid met 24gH(5+4+3).

Onder verwijzing nu naar figuur 38, is de vaccinia μ promotor aanwezig in het plasmide pSD486 VC (fig. 30). (In fig. 38 is dit plasmide aangeduid met SD486). Het met 2130 bp BglII Mung Bean nuclease behandelde fragment van 24gH(5+4+3) werd gekloneerd in het met BglII Mung-Bean nuclease behandelde pSD486VC. Deze laatste kloneringsstap brengt het gH gen onder de controle van de μ promotor. Het door deze manipulatie ontwikkelde plasmide werd aangeduid met 486gH (fig. 38).

Kloneren van het open afleesframe BBRF3 in het vaccinia virus donorplasmide pCOPSC-5H.

Het volledige BBRF3 open afleesframe is aanwezig in het BamHI B fragment van het EBV DNA. Dit fragment werd gedigereerd met BspHI, behandeld met het E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) en gedigereerd met BglII. De BglII plaats in het BamHI A fragment is 10 basen voor het stopcodon van BBRF3 geplaatst. Het 1230 bp BspHI-BglII fragment werd geïsoleerd en gekloneerd in het 4200 bp SmaI-BglII fragment van het plasmide pCOPSC-5H. (Plasmide pCOPCS-5H is identiek aan het plasmide pCOPCS657 (fig. 16)). Het plasmide dat bij deze manipulatie wordt gevormd werd aangeduid met COPACEBVX.

Kloneren van de EBV gp340, gB en gH genen in het vaccinia virus donorplasmide pSD513VCVQ.

Het vaccinia virus donorplasmide dat werd toegepast voor de vorming van de drievoudige EBV recombinant was het plasmide pSD513VCVQ (fig.29). Dit plasmide bevat een

sub-kloon van het Kopenhagen vaccinia virus HindIII J fragment, waarin de coderende volgorde voor het thymidine kinasegen is vervangen door een polylinkergebied.

Volgens een eerste stap werd het μ promoted EBV gH gen gekloneerd in pSD513VCVQ. In het bijzonder werd het 5 2300 bp SnaBI-BglII fragment van 486gH gekloneerd in het 4000 bp SmaI-BglII fragment van pSD513VCVQ. Het plasmide dat door deze manipulatie werd gevormd werd met 513UgH aangeduid.

Daarna werd het H6 promoted EBV gp340 gen geklo- 10 neerd in 513gH. In het bijzonder werd het met 2800 bp NotI Mung-Bean behandelde fragment van SP131gp340 gekloneerd in het met 6300 bp XhoI-PstI Mung-Bean nuclease behandelde fragment van 513UgH. Het volgens deze manipulatie gevormde 15 plasmide werd aangeduid met 513UgH340H6.

Daarna werd het H6 promoted EBV gB gen gekloneerd in 513UgH340H6. In het bijzonder werd het met 2700 bp HindIII Mung-Bean nuclease behandelde fragment van SP131gp340 gekloneerd in het met 9100 bp BglII Mung-Bean 20 nuclease behandelde fragment van 513UgH340H6. Het verkregen plasmide werd met 513gHgBgp340 (fig. 39) aangeduid.

Constructie van recombinant vaccinia virus.

EBV gp340 (donorplasmide 409H6340), EBV gp220 25 (donorplasmide 409H6220) en EBV gB (donorplasmide 409H6gB) werden gerecombineerd in het vaccinia virus vP458 (M2L plaats): deze enkelvoudige vaccinia virus recombinanten worden respectievelijk aangeduid met vP474, vP480 en vP561. EBV gH (donorplasmide 486gH) werd gerecombineerd in het 30 vaccinia virus vP533 (μ invoegplaats): deze enkelvoudige vaccinia virus recombinant wordt aangeduid met vP611.

Tenslotte werd de drievoudige vaccinia virus re- 35 combinant bevattende gp340, gB en gH verkregen door recombinatie van het donorplasmide 513gHgBgp340 in het vaccinia virus vP617 op de thymidine kinase invoegplaats. Dit recombinant virus wordt aangeduid met vP712. vP617 is een Kopenhagen vaccinia virus deleted voor de TK, HA en ATI

genen.

Immunofluorescentie van EBV eiwitten in met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

5 Immunofluorescentie-onderzoekingen uitgevoerd op cellen geïnfecteerd met vP474 (gp340) en vP480 (gp220) onder toepassing van het monoklonale antilichaam F29-89 (165) toonden aan dat EBV gp340 en EBV gp220 eiwitten op het plasmamembraan tot expressie waren gebracht.

10 Cellen geïnfecteerd met vP611 (gH), onder toepassing van een humaan serum, vertoonden een zwak positief signaal op het plasmamembraan.

) Tenslotte werd hetzelfde onderzoek uitgevoerd op cellen geïnfecteerd met vP712 (drievoudige EBV vaccinia recombinant): een positief signaal op het plasmamembraan werd verkregen met de monoklonale antilichamen F29-89 en NEA 9247 (gB specificiteit verkregen van DuPont).

Immunoprecipitatie van EBV eiwitten in met recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

20 Het EBV gp340 glycoproteïne gevormd in met EBV geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van ongeveer 340 kDa (165). Cellen geïnfecteerd met de recombinant vaccinia virussen vP474 of vP712 vormen eveneens een door
25 EBV gecodeerd eiwit van ongeveer 340 kDa (immunoprecipitatie uitgevoerd met het monoklonale antilichaam F29-89). Het EBV gp220 glycoproteïne heeft een molecuulgewicht van 220 kDa (165). Cellen geïnfecteerd met het vaccinia recombinant virus vP480 produceren een door EBV gecodeerd eiwit van
30 ongeveer 220 kDa.

Het EBV gB glycoproteïne geproduceerd in met EBV geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van 110 kDa tot 125 kDa met één voorlopervorm van 93 kDa (206, 208).
35 Cellen geïnfecteerd met de recombinant vaccinia virussen vP561 of vP712 vormen een EBV hoofdeiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 125 kDa en vier kleinere eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 80 kDa, 60 kDa, 50 kDa en 45

kDa.

Het EBV gH glycoproteïne gevormd in met EBV geïnfekteerde cellen heeft een molecuulgewicht van 85 kDa met een voorlopervorm van 70 kDa (209). Cellen geïnficeerd met het recombinant virus vP611 vormen een door EBV gecodeerd eiwit van ongeveer 85 kDa.

Immunisatie van konijnen met vaccinia recombinanten die EBV glycoproteïnen tot expressie brengen.

10 Konijnen werden geïmmuniseerd met vP474 (gp340) of vP480 (gp220) of vP561 (gB) of vP611 (gH) of vP712 (triple). Na een boost werden de sera onderzocht door immunofluorescentie op met TPA behandelde B95-8 cellen. Telkens werden positieve signalen verkregen. In vitro 15 neutraliserende werking werd gedemonstreerd onder toepassing van de sera gekweekt tegen vP474 (gp340).

Voorbeeld 17

Kloneren en expressie van humaan cytomegalovirus glycoproteïne antigenen in pokkenvirusvectoren.

Kloneren van het HCMV gB gen in het vaccinia donorplasmide pMP409DVC.

Onder verwijzing nu naar figuur 40 werd het 4800 bp HindIII-BamHI fragment van het HindIII D fragment van 25 het HCMV DNA gekloneerd in het 2800 bp HindIII-BamHI fragment van het plasmide pIBI24. Door in vitro nutagenese (17, 185) onder toepassing van de oligonucleotiden CMVM5 (GCCTCATCGCTGCTGGATATCCGTTAAGTTTGATCGTAATGGAATCCAGGATCTG) en CMVM3 (GACAGATTGTGATTTTATAAGCATCGTAAGCTGTCA), werd het 30 HCMV gB gen gemodificeerd om onder de controle van de vaccinia H6 promotor tot expressie te worden gebracht. Het plasmide dat het gemodificeerde HCMV gB gen bevatte werd aangeduid met 24CMVgB(5+3) (fig. 40).

Daarna werd het 2900 bp EcoRV-BamHI fragment van 35 24CMVgB(5+3) gekloneerd in het 3100 bp EcoRV-BglIII fragment van plasmide pSP131 dat de synthetische H6 promotor bevat (69). Deze kloneringsstap brengt het HCMV gB gen onder de

controle van de vaccinia H6 promotor. Het verkregen plasmide werd aangeduid met SP131gB.

- 5 Tenslotte werd het H6 promoted HCMV gB gen geklo-
neerd in het vaccinia donorplasmide pMP409DVC. Het met 3000
bp HindIII Mung Bean nuclease behandelde fragment van
SP131gB werd gekloneerd in de met BglII Mung Bean nuclease
behandelde plaats van pMP409DVC. Het verkregen plasmide
werd aangeduid met 409CMVgB (fig. 40).

10 Constructie van recombinant vaccinia virus.

Het H6 promoted CMV gB gen in plasmide 409CMVgB
werd ingevoegd op de M2L plaats van het reddende virus
vP458. Het recombinant vaccinia virus werd aangeduid met
vP525.

15

Immunofluorescentie van CMV gB proteïne in met
recombinant vaccinia virus geïnfecteerde cellen.

- Immunofluorescentie-onderzoekingen op cellen
geïnfecteerd met vP525 onder toepassing van een monoklonaal
20 antilichaam of een guinees biggetje polykonaal serum wezen
op HCMV gB tot expressie gebracht op het plasmamembraan.

Immunoprecipitatie van CMV gB in met recombinant
vaccinia geïnfecteerde cellen.

- 25 Het CMV gB glycoproteïne geproduceerd in met CMV
geïnfecteerde cellen heeft een molecuulgewicht van 55 kDa
met een voorlopervorm van 130 kDa (172). Cellen geïnfec-
teerd met vP525 geven twee met CMV gB gecodeerde eiwitten
van ongeveer 130 kDa en 55 kDa.

30

Nucleotidevolgorden van HXLF1 en HXLF2.

- De HXLF genfamilie is gelokaliseerd in het HindIII
X fragment van het HCMV genomische DNA (172). Onder toepas-
sing van specifieke oligonucleotide primers werd de nucleo-
35 tidevolgorde van HXLF1 en HXLF2 bepaald (fig. 41 en 42).
HXLF1 is 648 nucleotiden lang en codeert voor een eiwit met
215 aminozuren. HXLF2 is 558 nucleotiden lang en codeert

- voor een eiwit met 185 aminozuren. De nucleotidevolgorden van dezelfde genen (AD169 HCMV stam) zijn gepubliceerd (173) en uit vergelijkingsonderzoekingen blijkt een 99 %-ige homologie voor HXLF1 en een 96 %-ige homologie voor HXLF2.

Immunisatie van guinese biggetjes met vaccinia recombinanten die HCMV antigenen tot expressie brengen.

- Drie guinese biggetjes werden geïmmuniseerd met vp525. Na één boost ontwikkelden de dieren HCMV neutraliserende antilichamen (gemiddelde titer: 518). Het is interessant dat 50-87 % van de neutraliserende werking van HCMV seropositieve humane sera kunnen worden geabsorbeerd uit met vp525 geïnfecteerde cellen. Uit dit resultaat blijkt het potentiële belang van HCMV gB als een sub-eenheidsvaccin.

REFERENCES

1. Allen, G.P. and J.T. Bryans, In: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, Vol. 2, ed. R. Pandey (Basel), pp. 78-144 (1986).
2. Allen, G.P., and L.D. Coogle, J. Virol. 62, 2850-2858 (1988).
3. Allen, G.P. and M.R. Yeargan, J. Virol. 61, 2454-2461 (1987).
4. Baumann, R.P., D.C. Sullivan, J. Staczek, and D.J. O'Callaghan, J. Virol. 57, 816-825 (1986).
5. Ben-Porat, T., J. DeMarchi, B. Lomniczi, and A. Kaplan, Virology 154, 325-334 (1986).
6. Berman, P.W., D. Dowbenko, L.A. Lasky, and C.C. Simonsen, Science 222, 524-527 (1983).
7. Bertholet, C., R. Drillien, and R. Wittek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096-2100 (1985).
8. Cantin, E.M., R. Eberle, J.L. Baldick, B. Moss, D.E. Willey, A.L. Notkins, and H. Openshaw, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5908-5912 (1987).
9. Chakrabarti, S., K. Brechling, and B. Moss, Mol. Cell. Biol. 5, 3403-3409 (1985).
10. Cranage, M.P., T. Kouzarides, A.T. Bankier, S. Satchwell, K. Weston, P. Tomlinson, B. Barrell, H. Hart, S.E. Bell, A.C. Minson, and G.L. Smith, EMBO J. 5, 3057-3063 (1986).
11. Clewell, D.B., J. Bacteriol. 110, 667-676 (1972).
12. Clewell, D.B. and D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166 (1969).
13. Cremer, K.J., M. Mackett, C. Wohlenberg, A.L. Notkins, and B. Moss, Science 228, 737-740 (1985).
14. Eisenberg, D., Annu. Rev. Biochem. 53, 595-623 (1984).
15. Glorioso, J., U. Kees, G. Kumel, H. Kirchner, and P. Krammer, J. Immunol. 135, 575-582 (1985).
16. Graham, F.L. and A.J. Van der Eb., Virology 54, 536-539 (1973).
17. Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492 (1985).
18. Lasky, L.A., D. Dowbenko, C.C. Simonsen, and P.W. Berman, Bio-Technology 2, 527-532 (1984).

19. Mandecki, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7177-7181 (1986).
20. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) (1982).
21. Martin, S. and B.T. Rouse, J. Immunol. 138, 3431-3437 (1987).
22. Martin, S., B. Moss, P.W. Berman, L.A. Lasky, and B.T. Rouse, J. Virol. 61, 726-734 (1987).
23. O'Callaghan, D.J., B.E. Henry, J.H. Wharton, S.A. Dauenhauer, R.B. Vance, J. Staczek, and R.A. Robinson, In: Developments in Molecular Virology, Vol. 1, ed. Y. Decker, pp. 387-418 (1981).
24. Panicali, D., A. Grzelecki, and C. Huang, Gene 47, 193-199 (1986).
25. Panicali, D., and E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931 (1982).
26. Paoletti, E., B.R. Lipinskas, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 193-197 (1984).
27. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas, and E. Paoletti, Science 222, 981-984 (1985).
28. Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, In: Methods in Enzymology, Vol. 153, eds. Wu, R., and L. Grossman (Academic Press) pp. 545-563 (1987).
29. Pustell, J., and F.C. Kafatos, Nucleic Acids Res. 12, 643-655 (1984).
30. Rooney, J.F., C. Wohlenberg, K.J. Cremer, B. Moss, and A.L. Notkins, J. Virol. 62, 1530-1534 (1988).
31. Rosel, J.L., P.L. Earl, J.P. Weir, and B. Moss, J. Virol. 60, 436-449 (1986).
32. Rosenthal, K.L., J.R. Smiley, S. South, and D.C. Johnson, J. Virol. 61, 2438-2447 (1987).
33. Sanger, F., S. Nicklen, and A. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977).
34. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, and M.J. Casadaban, Gene 25, 71-82 (1983).
35. Shida, H., Virology 150, 451-462 (1986).

36. Spear, P.G., In: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines, Immunochemistry of Viruses, Vol. 2, eds. M.H.V. Van Regenmortel and A.R. Neurath (New York), pp. 425-443 (1985).
37. Spear, P.G., In: The Herpesvirus, Vol. 3, ed. B. Roizman (New York), pp. 315-356 (1985).
38. Sullivan, V. and G.L. Smith, J. gen. Virol. 68, 2587-2598 (1987).
39. Sullivan, V. and G.L. Smith, J. gen. Virol. 69, 859-867 (1988).
40. Tabor, S., and C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767-4771 (1987).
41. Taylor, J., R. Weinberg, B. Lanquet, P. Desmettre, and E. Paoletti, Vaccine 6, 497-503 (1988).
42. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawacka, R. Webster, and E. Paoletti, Vaccine 6, 504-508 (1988).
43. Turtinen, L.W., and G.P. Allen, J. gen. Virol. 63, 481-485 (1982).
44. Wachsman, M., L. Aurelian, C.C. Smith, B.R. Lipinskas, M.E. Perkus, and E. Paoletti, J. Infect. Dis. 155, 1188-1197 (1987).
45. Yuen, L. and B. Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6417-6421 (1987).
46. Zarling, J.M., P.A. Moran, L.A. Lasky, and B. Moss, J. Virol. 59, 506-509 (1986).
47. Zarling, J.M., P.A. Moran, R.L. Burke, C. Pachl, P.W. Berman, and L.A. Lasky, J. Immunol. 136, 4669-4673 (1986).
48. O'Callaghan, D.J., G.A. Gentry, and C.C. Randall, In: The Herpesviruses, Vol. 2, ed. B. Roizman (New York), pp. 215-318 (1983).
49. Ackermann, M., R. Longnecker, B. Roizman, and L. Pereira, Virology 150, 207-220 (1986).
50. Frink, R.J., M.R. Eisenberg, G. Cohen, and E.K. Wagner, J. Virol. 45, 634-647 (1983).
51. Frame, M.C., H.S. Marsden, and D.J. McGeoch, J. gen. Virol. 67, 745-751 (1986).

52. Longnecker, R., S. Chatterjee, R. Whitley, and B. Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4303-4307 (1987).
53. Richman, D.D., A. Buckmaster, S. Bell, C. Hodgman and A.C. Minson, J. Virol. 57, 647-655 (1986).
54. Swain, M.A., R.W. Peet, and D.A. Galloway, J. Virol, 53, 561-569 (1985).
55. Zezulak, K.M., and P.G. Spear, J. Virol. 49, 741-747 (1984).
56. van Drunen Littel-van der Hurk, S., T. Zamb, and L.A. Babrick, J. Virol. 53, 2159-2168 (1989).
57. Perkus, M.E., D. Panicali, S. Mercer, and E. Paoletti, Virology 152, 285-297 (1986).
58. Tamin, A., E.C. Villarreal, S.L. Weinrich, and D.E. Hruby, Virology 165, 141-150 (1988).
59. Whalley, J.M., G.R. Robertson, and A.J. Davidson, J. gen. Virol. 57, 307-323 (1981).
60. Laemmli, U.K., Nature (London) 227, 680-685 (1970).
61. Hagenbuchle, O., M. Santer, J.A. Steitz, and R.J. Mans, Cell 13, 551-563 (1978).
62. Robbins, A.K., D.J. Dorney, M.W. Wathen, M.E. Whealey, C. Gold, R.J. Watson, L.E. Holland, S.D. Weed, M. Levine, J.C. Glorioso, and L.W. Enquist, J. Virol. 61, 2691-2701 (1987).
63. Whitbeck, J.C., L.Z. Bello, and W.C. Lawrence, J. Virol. 62, 3319-3327 (1988).
64. Montreuil, J., J. Biol. Cell. 51, 115-132 (1984).
65. Kyte, J., and R.F. Doolittle, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982).
66. Davison, A.J., and J.E. Scott, J. gen. Virol. 67, 1759-1816 (1986).
67. Bzik, D.J., B.A. Fox, N.A. DeLuca, and S. Person, Virology 133, 301-307 (1984).
68. Pellett, P.E., M.D. Biggin, B.L. Barrell, and B. Roizman, J. Virol. 56, 807-813 (1985).
69. Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 3829-3836 (1989).
70. Gillard, S., D. Spehner, R. Drillien, and A. Kirn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5573-5577 (1986).

71. Whalley, J.M., G.R. Robertson, N.A. Scott, G.C. Hudson, C.W. Bell, and L.M. Woodworth, J. gen. Virol. 70, 383-394 (1989).
72. Riggio, M.P., A.A. Cullinane, and D.E. Onions, J. Virol. 63, 1123-1133 (1989).
73. Glorioso, J., C.H. Schroder, G. Kumel, M. Szczesiul, and M. Levine, J. Virol. 50, 805-812 (1984).
74. Wachsman, M., L. Aurelian, J.C.R. Hunter, M.E. Perkus, and E. Paoletti, Bioscience Reports 8, 323-334 (1988).
75. Wachsman, M., J.H. Luo, L. Aurelian, M.E. Perkus, and E. Paoletti, J. gen. Virol. 70, 2513-2520 (1989).
76. Sinclair, R., R.F. Cook, and J.A. Mumford, J. gen. Virol. 70, 455-459 (1989).
77. Shimizu, M., K. Satou, and N. Nishioka, Arch. Virol. 104, 169-174 (1989).
78. Stokes, A., G.P. Allen, L.A. Pullen, and P.K. Murray, J. gen. Virol. 70, 1173-1183 (1989).
79. McGeoch, D.J., A. Dolan, S. Donald, and F.J. Rixon, J. Mol. Biol. 181, 1-13 (1985).
80. Petrovskis, E.A., J.G. Timmins, and L.E. Post, J. Virol. 60, 185-193 (1986).
81. Wittmann, G. and H.-J. Rziha, In: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, ed. G. Wittmann (Kluwer Academic Publishers) pp. 230-325 (1989).
82. Rubenstein, A.S. and A.S. Kaplan, Virology 66, 385-392 (1975).
83. Stevely, W.S., J. Virol. 22, 232-234 (1977).
84. Ben-Porat, T., F.J. Rixbn, and M.L. Blankenship, Virology 95, 285-294 (1979).
85. Ben-Porat, T. and A.S. Kaplan, In: The Herpesviruses, vol. 3, ed. B. Roizman (Plenum Publishing Corp., New York) pp. 105-173 (1985).
86. Hampl, H., T. Ben-Porat, L. Ehrlicher, K-O. Habermehl, and A.S. Kaplan, J. Virol. 52, 583-590 (1984).
87. Ben-Porat, T. In: Organization and replication of viral DNA, ed. A.S. Kaplan (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL) pp. 147-172 (1982).
88. Ben-Porat, T., J. DeMarchi, J. Pendrys, R.A. Veach, and A.S. Kaplan, J. Virol. 57, 191-196 (1986).

89. Ben-Porat, T. and A.S. Kaplan, *Virology* 41, 265-273 (1970).
90. Killington, R.A., J. Yeo, R.W. Honess, D.H. Watson, B.E. Duncan, I.W. Halliburton, and J. Mumford, *J. gen. Virol.* 37, 297-310 (1977).
91. Robbins, A.K., J.H. Weis, L.W. Enquist, and R.J. Watson, *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 485-496 (1984).
92. Rea, T.J., J.G. Timmins, G.W. Long, and L.E. Post, *J. Virol.* 54, 21-29 (1985).
93. Mettenleiter, T.C., N. Lukacs, and H.-J. Rziha, *J. Virol.* 53, 52-57 (1985).
94. Mettenleiter, T.C., N. Lukacs, H.-J. Thiel, C. Schreurs, and H.-J. Rziha, *Virology* 152, 66-75 (1986).
95. Petrovskis, E.A., J.G. Timmins, M.A. Armentrout, C.C. Marchioli, R.J. Yancey, Jr., and L.E. Post, *J. Virol.* 52, 216-223 (1986).
96. Robbins, A.K., R.J. Watson, M.E. Whealy, W.W. Hays, and L.W. Enquist, *J. Virol.* 52, 339-347 (1986).
97. Wathen, M.W. and L.M.K. Wathen, *J. Virol.* 51, 57-62 (1984).
98. Kost, T.A., E.V. Jones, K.M. Smith, A.P. Reed, A.L. Brown, and T.J. Miller, *Virology* 171, 365-376 (1989).
99. Mettenleiter, T.C., N. Lukacs, and H.-J. Rziha, *J. Virol.* 56, 307-311 (1985).
100. Lomniczi, B., S. Watanabe, T. Ben-Porat, and A.S. Kaplan, *J. Virol.* 52, 198-205 (1984).
101. Lukacs, N., H.-J. Thiel, T.C. Mettenleiter, and H.-J. Rziha, *J. Virol.* 53, 166-173 (1985).
102. Marchioli, C., R.J. Yancey, Jr., J.G. Timmins, L.E. Post, B.R. Young, and D.A. Povendo, *Am. J. Vet. Res.* 49, 860-864 (1988).
103. Marchioli, C.C., R.J. Yancey, Jr., R.C. Wardley, D.R. Thomsen and L.E. Post, *Am. J. Vet. Res.* 48, 1577-1583 (1987).
104. Thomsen, D.R., C.C. Marchioli, R.J. Yancey, Jr. and L.E. Post, *J. Virol.* 61, 229-232 (1987).
105. Wathen, L.M.K., K.B. Platt, M.W. Wathen, R.A. Van Deusen, C.A. Whetstone, and E.C. Pirtle, *Virus Res.* 4, 19-29 (1985).

106. Eloit, M., D. Fargeaud, R. L'Haridon and B. Toma, Arch. Virol. 99, 45-46 (1988).
107. Marchioli, C.C., R.J. Yancey, Jr., E.A. Petrovskis, J.G. Timmins, and L.E. Post, J. Virol. 61, 3977-3982 (1987).
108. Ishii, H., Y. Kobayashi, M. Kuroki and Y. Kodama, J. gen. Virol. 69, 1411-1414 (1988).
109. Whealy, M.E., A.K. Robbins and L.W. Enquist, J. Virol. 63, 4055-4059 (1989).
110. Wathen, M.W. and L.M.K. Wathen, J. Virol. 58, 173-178 (1986).
111. Robbins, A.K., M.E. Whealy, M.E., R.J. Watson and L.W. Enquist, J. Virol. 59, 635-645 (1986).
112. Allen, W.P., and F. Rapp, J. Infect. Dis. 145, 413-421 (1982).
113. Bryson, Y.J., M. Dillon, M. Lovett, G. Acuna, S. Taylor, J.D. Cherry, B.L. Johnson, E. Wiesmeier, W. Growdon, T. Creagh-Kirk, and R. Keeney, N. Engl. J. Med. 308, 916-921 (1983).
114. Douglas, J.M., C. Critchlow, J. Benedetti, G.J. Mertz, J.D. Connor, M.A. Hintz, A. Fahnlander, M. Remington, C. Winter, and L. Corey, N. Engl. J. Med. 310, 1551-1556 (1984).
115. Roizman, B. and A.E. Sears, In: Virology, eds. Fields, B.N. and D.M. Knipe (Raven Press, Ltd., New York) pp. 1795-1841 (1990).
116. Stuve, L.L., S. Brown-Shimer, C. Pacht, R. Najarian, D. Dina, and R.L. Burke, J. Virol. 61, 326-335 (1987).
117. Dowbenko, D.J., and L.A. Lasky, J. Virol. 52, 154-163 (1984).
118. Watson, R.J., Gene 26, 307-312 (1983).
119. McGeoch, D.J., H.W.M. Moss, D. McNab and M.C. Frame, J. gen. Virol. 68, 19-38 (1987).
120. Chan, W., Immunol. 42, 343-352 (1983).
121. Davis, W.B., J.A. Taylor, and J.E. Oakes, J. Infect. Dis. 140, 534-540 (1979).
122. Oakes, J.E., and H. Rosemond-Hornbeak, Infect. Immun. 21, 489-495 (1978).

123. Balachandran, N., S. Bacchetti, and W.E. Rawls, *Infect. Immun.* 37, 1132-1137 (1982).
124. Oakes, J.E., W.B. Davis, J.A. Taylor, and W.W. Weppner, *Infect. Immun.* 29, 642-649 (1980).
125. McLaughlin-Taylor, E., D.E. Willey, E.M. Cantin, R. Eberle, B. Moss, and H. Openshaw, *J. gen. Virol.* 69, 1731-1734 (1988).
126. Weir, J.P., M. Bennett, E.M. Allen, K.L. Elkins, S. Martin, and B.T. Rouse, *J. gen. Virol.* 70, 2587-2594 (1989).
127. Gibbs, E.P.J., and M.M. Rweyemamu, *Vet. Bull.* 47, 317-343 (1977).
128. Yates, W.D.G., *Can. J. Comp. Med.* 46, 225-263 (1982).
129. Misra, V., R.M. Blumenthal and L.A. Babiuk, *J. Virol.* 40, 367-378 (1981).
130. Lawrence, W.C., R.C. D'Urso, C.A. Kundel, J.C. Whitbeck and L.J. Bello, *J. Virol.* 60, 405-414 (1986).
131. Zamb, T. 1987, Abstract No. 330, 68th Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Disease, 16 and 17 November 1987, Chicago, IL., USA.
132. Babiuk, L.A., J. L'Italien, S. van Drunen Littel-van den Hurk, T. Zamb, M.J.P. Lawman, G. Hughes, and G.A. Gifford, *J. Virol.* 159, 57-66 (1987).
133. van Drunen Littel-van den Hurk, S., and L.A. Babiuk, *J. Virol.* 59, 401-410 (1986).
134. Gaskel, R.M., and R.C. Povey, *Res. Vet. Sci.* 27, 167-174 (1978).
135. Povey R.C., and M.R. Wilson, *Feline Practice* 8, 35-42 (1978).
136. Chappuis, G., C. Benoit-Jeanin, and D. Fargeaud, In: *Develop. biol. Standard.*, Vol. 52, eds. M. Bonneau, and W. Hennessen, (S. Karger, Basel) pp. 485-491 (1982).
137. Saint-Gerand, A.L., *Vaccine* 6, 508 (1988).
138. Sarmiento, M., M. Haffey, and P.G. Spear, *J. Virol.* 29, 1149-1158 (1979).
139. Ruyechan, W.T., L.S. Morse, D.M. Knipe, and B. Roizman, *J. Virol.* 29, 677-697 (1979).

140. Pereira, L., E. Cassai, R.W. Honess, B. Roizman, M. Teřni, and A. Nahmias, *Infect. Immun.* 13, 211-220 (1976).
141. Eberle, R., and R.J. Courtney, *J. Virol.* 35, 902-917 (1980).
142. Papp-Vid, G., and J.B. Derbyshire, *Can. J. Comp. Med.* 43, 231-233 (1979).
143. Meas, R.K., S.L. Fritsch, L.L. Herr, and P.A. Rota, *J. Virol.* 51, 259-262 (1984).
144. Fargeaud, D., C. Benoit Jeannin, F. Kato, and G. Chappuis, *Arch. Virol.* 80, 69-82 (1984).
145. Compton, T., *In: Cell Biology of Virus Entry, Replication, and Pathogenesis*, eds. Compans, R.W., A. Helenius, and M.B.A. Oldstone (Alan R. Liss, Inc.) pp. 45-56 (1989).
146. Spatz, S.J., R.K. Meas, and C.E. Beisel, *Abstracts of the 14th International Herpesvirus Workshop (Nyborg Strand Denmark)* H2. 128 (1989).
147. Little, S.P., J.T. Jofre, R.J. Courtney, and P.A. Schaffer, *Virology* 114, 149-160 (1981).
148. DeLuca, N., D.J. Bzik, V.C. Bond, S. Person, and W. Snipes, *Virology* 122, 411-423 (1982).
149. Cai, W., B. Gu, and S. Person, *J. Virol.* 62, 2596-2604 (1988).
150. Courtney, R.J., *In: Immunobiology of Herpes Simplex Virus Infection*, eds. B.T. Rouse and C. Lopez (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.) pp. 33-44 (1984).
151. Kozak, M., *Microbial Rev.* 47, 1-45 (1983).
152. Pelletier, J., and N. Sonenberg, *Nature* 334, 320-325 (1988).
153. Rota, P.A., R.K. Maes, and W.T. Ruyechan, *Virology* 154, 168-179 (1986).
154. Henle, G., W. Henle, and V. Diehl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 94-101 (1968).
155. Kozak, M., *Cell* 44, 283-292 (1986).
156. Miller, G., *In: Virology, Second Edition*, eds. Fields, B.N. *et al.* (Raven Press, Ltd., New York) blz. 1921-1958 (1990).

157. Hubbard, S.C., and R.J. Ivatt, *Ann. Rev. Biochem.* 50, 555-583 (1981).
158. McGeoch, D.J., M.A. Dalrymple, A.J. Davison, A. Dolan, M.C. Frame, D. McNab, L.J. Perry, J.E. Scott, and P. Taylor, *J. gen. Virol.* 69, 1531-1574 (1988).
159. Kieff, E., and D. Liebowitz, *In: Virology*, Second Edition, eds. Fields, B.N. et al. (Raven Press, Ltd., New York) pp. 1889-1920 (1990).
160. Watson, R.J., J.H. Weis, J.S. Salstrom, and L.W. Enquist, *Science* 218, 381-384 (1982).
161. McGeoch, D.J. and A.J. Davison, *Nucleic Acid Res.* 10, 4281-4292 (1986).
162. Lehner, R., H. Meyer, and M. Mach, *J. Virol.* 63, 3792-3800 (1989).
163. Biggin, M., P.J. Farrell, and B.G. Barrell, *EMBO. J.* 3, 1083-1090 (1984).
164. Beisel, C., J. Tanner, T. Matsuo, D. Thorley-Lawson, F. Kozdy, and E. Kieff, *J. Virol.* 54, 665-674 (1985).
165. Quattiere, L.F., J.F. Decoteau, and M. Hassan Nasr-el-Din, *J. gen. Virol.* 68, 535-543 (1987).
166. Epstein, M.A., A.J. Morgan, S. Finerty, B.J. Randle, and J.K. Kirkwood, *Nature* 318, 287-289 (1985).
167. Morgan, A.J., M. Mackett, S. Finerty, J.R. Arrand, F.T. Scullion, and M.A. Epstein, *J. Med. Virol.* 25, 189-195 (1988).
168. Strnad, B.C., T. Schuster, R. Klein, R.F. Hopkins, T. Witmer, R.H. Neubauer, and H. Rabin, *J. Virol.* 41, 258-264 (1982).
169. Miller, N., and L.M. Hutt-Fletcher, *J. Virol.* 62, 2366-2372 (1988).
170. Plotkin, S.A., H.M. Friedman, S.E. Starr, and E. Gonczol, *In: Contemporary Issues in Infectious Diseases*, Vol. 8, eds. Root et al. (Churchill Livingstone, New York) 112, 65-92 (1989).
171. Plotkin, S.A., S.E. Starr, H.M. Friedman, E. Gonczol, and R.E. Weibel, *J. Inf. Dis.* 159, 860-865 (1989).
172. Gretch, D.R., B. Kari, L. Rasmussen, R.C. Gehrz, and M.F. Stinski, *J. Virol.* 62, 875-881 (1988).

173. Weston, K., and B.G. Barrell, J. Mol. Biol. 192, 177-208 (1986).
174. Pachl, C., W.S. Probert, K.M. Hermesen, F.R. Masiaz, L. Rasmussen, T.C. Merigan, and R.R. Spaete, Virology 169, 418-426 (1989).
175. Rasmussen, L., M. Nelson, M. Neff, and T.C. Merigan, Jr., Virology 163, 308-318 (1988).
176. Kari, B., N. Lussenhop, R. Goertz, M. Wabuke-Bunoti, R. Radeke, and R. Gehr, J. Virol. 60, 345-352 (1986).
177. Boyle, D.B., and B.E.H. Coupar, Virus Res. 10, 343-356 (1988).
178. Nettleton, P.F., and J.M. Sharp, Vet. Rec. 107, 379 (1980).
179. Kahrs, R.F., J. Amer. Vet. Med. Assoc. 171, 1055-1064 (1977).
180. McLauchlan, J., D. Gaffney, J.L. Whitton, and J.B. Clements, Nucleic Acids Res. 13, 1347-1368 (1985).
181. Davison, A.J., EMBO J. 2, 2203-2209 (1983).
182. Todd, D. and J.B. McFerran, Arch. Virol. 86, 167-176 (1985).
183. Diamond, L., Int. J. Cancer 2, 143-152 (1967).
184. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 4189-4198 (1989).
185. Russel, M., S. Kidd, and M.R. Kelley, Gene 45, 333-338 (1986).
186. Kunkel, T.A., J.D. Roberts, and R.A. Zakour, In: Methods in Enzymology, Vol. 154, eds. R. Wu, and L. Grossman (Academic Press, Inc.) pp. 367-382 (1987).
187. Schmitt, J.F.C. and H.G. Stunnenberg, J. Virol. 62, 1889-1897 (1988).
188. Pickup, D.J., B.S. Ink, W. Hu, C.A. Ray, and W.K. Joklik, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7698-7702 (1986).
189. Southern, E.M., J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).
190. Bucher, D., S. Popple, M. Baer, A. Mikhail, Y.-F. Gong, C. Whitaker, E. Paoletti, and A. Judd, J. Virol. 63, 3622-3633 (1989).
191. Joklik, W.K., Virology 18, 9-18 (1962).

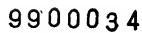
192. Guilhot, S., A. Hampe, L. D'Auriol, and F. Galibert, *Virology* 161, 252-258 (1987).
193. Falkner, F.G., and B. Moss, *J. Virol.* 62, 1849-1854 (1988).
194. Boyle, D.B., and B.E.H. Coupar, *Gene* 65, 123-128 (1988).
195. Dreyfuss, G., S.A. Adam, and Y.D. Choi, *Mol. Cell. Biol.* 4, 415-423 (1984).
196. Kennedy, I.M., D.P. Leader, and W.S. Stevely, *J. gen. Virol.* 65, 1621-1624 (1984).
197. Powell, K.L. and D.H. Watson, *J. gen. Virol.* 29, 167-178 (1975).
198. Marsden, H.S., N.D. Stow, V.G. Preston, M.C. Timbury, and N.M. Wilkie, *J. Virol.* 28, 624-642 (1978).
199. Marsden, H.S., A. Buckmaster, J.W. Palfreyman, R.G. Hope, and A.C. Minson, *J. Virol.* 50, 547-554 (1984).
200. Zweig, M., S.D. Showalter, S.V. Bladen, C.J. Heilman, Jr. and B. Hampar, *J. Virol.* 47, 185-192 (1983).
201. Marshall, R.L., B.A. Israel, and G.J. Letchworth, III., *Virology* 165, 338-347 (1988).
202. Panicali, D., S.W. Davis, S.R. Mercer, and E. Paoletti, *J. Virol.* 37, 1000-1010 (1981).
203. Misra V., R. Nelson, and M. Smith, *Virology* 166, 542-549 (1988).
204. Keller, P.M., A.J. Davison, R.S. Lowe, C.D. Bennett, and R.W. Ellis, *Virology* 152, 181-191 (1986).
205. Bzik, D.J., C. Debroy, B.A. Fox, N.E. Pederson, and S. Person, *Virology* 155, 322-333 (1986).
206. Gong, M., T. Ooka, T. Matsuo, and E. Kieff, *J. Virol.* 61, 499-508 (1987).
207. Baer, R., A.T. Bankier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrell, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell, C. Seguin, P.S. Tuffnell, and B.G. Barrell, *Nature* 310, 207-211 (1984).
208. Emini, E.A., J. Luka, M.E. Armstrong, P.M. Keller, R.W. Ellis, and G.R. Pearson, *Virology* 157, 552-555 (1987).
209. Heineman, T., M. Gong, J. Sample, and E. Kieff, *J. Virol.* 62, 1101-1107 (1988).
210. Patel, D.D., and D.J. Pickup, *Embo J.* 6, 3787-3794 (1987).

C O N C L U S I E S

1. Recombinant pokkenvirus dat daarin DNA van kat herpesvirus bevat.
- 5 2. Recombinant pokkenvirus volgens conclusie 1, waarin het DNA aanwezig is in een niet-essentieel gebied van het pokkenvirusgenoom.
3. Recombinant pokkenvirus volgens conclusie 1 of 2, waarin het pokkenvirus verder een promotor voor het tot
10 expressie brengen van het DNA bevat.
4. Recombinant pokkenvirus volgens één van de voorgaande conclusies, waarin het pokkenvirus een vaccinia virus of een vogelpokkenvirus, in het bijzonder een pluimveepokkenvirus of een kanariepokkenvirus, is.
- 15 5. Recombinant pokkenvirus volgens één van de voorgaande conclusies, waarin het DNA codeert voor een kat herpesvirus glycoproteïne.
6. Recombinant pokkenvirus volgens conclusie 5, waarin het DNA codeert voor, of het kat herpesvirus glycoproteïne omvat, kat herpesvirus gB.
20
7. Werkwijze voor het produceren van een kat herpesvirus glycoproteïne, omvattende het in contact brengen van het recombinante pokkenvirus volgens conclusie 5 of 6 met een gastheercel in vitro onder omstandigheden
25 die geschikt zijn voor expressie van het kat herpesvirus glycoproteïne.
8. Gebruik van het recombinante pokkenvirus volgens één van de conclusies 1-6 bij de bereiding van een immunogene of vaccin-samenstelling tegen kat herpesvirus.
- 30 9. Samenstelling die het recombinante pokkenvirus volgens één van de conclusies 1-6 omvat.
10. Vaccin voor het induceren van een immunologische respons bij een gastheerdier ingeënt met het vaccin, welk vaccin een drager en het recombinante pokkenvirus
35 volgens één van de conclusies 1-6 omvat.

-O-O-O-O-O-O-

9900034



90 GAATTCAATAAGATAAAACCCCTTAAACAGCCCTTTGGTCGATGGTATGTTTAACTTCCGACCACTGGAGTTATTTCGCTTTT
 180 CTGGCGGAATAGCAACGACCCCGCCCGGAGAGATGCTTGGCTATCTGCTGAGATTGCTGGCGGTCCGCTATCTATCTGCTGCGCGG
 M W L P N L V R F V A V A Y L I C S A G
 270 GCGATATTAACTTATGCTCTTGGAGTACTGCTAGCTCCAGCCAGTACGCGCGCTACCACTACACAACTCCGATCTTAACTTACC
 A I L I Y A S G A S A S S S Q S T P A T P T H T T P N L T T
 360 GCACAGCGCGCGCTCTGACACACAACATAACGCAAGGTACAGAATCTTACACACTCCGATCAACGCAACAATCACTGCACCAAGAT
 A H G A G S D N I I N A N G T E S I H S H E T I T C T K S
 450 CTGATATCTGCGCTACTACAAATCTGTGATATGATCACTGACAACTGCTAGCGCTAAATTTAGCGAGTACGCGCTCGAGATTAC
 L I S V P Y Y K S V D H N C T T S V G V I S E Y R L E I Y
 540 TTGACCGCGCAGCCGATTTTCGGTACGCCCCCGCGGACAGAGAACTACATCAACCTAAGCCGCAACCAAGGATCAGACTCTGCTG
 L N Q R T P F S G T P P G D E E N Y I N H N A T K D Q T L L
 630 TTATTCTCAGCGCAGAGGCAAAAATCTGAAGGGTGGCGAGCTTGGAGTTATCCGACAGCGCTACCAAGCGCGCAGCTGTTTAA
 L F S T A E R K K S R R G G Q L G V I P D R L P K R Q L F N
 720 CTTCGCTCCACAGCGAGGTGGTACAAAATTCGACTGACCATCAAAATCTGTAGATTGGGGCAGAGCGGCATTTAGTCTGTGCTTG
 L F L H T E G G T K F P L T I K S V D W R T A G I Y V W S L
 830 TATGCCAAAATGGCAGGCTTTAAGTACGACGAGCTTACGGTCTCAACCTACACCGCAGCTTCTGAGACTTTCCGTTACCGGAGC
 Y A K N G T L V N S T S V T V S T Y N A P L L D L S V H P S
 920 CTGAAGGGGAAACTACAGGCGCAGCTGCTGCTGGCAAGCTACTTTCCACAGACTTCGCTCAAGCTGCGGTGGTACAAAATGCGCCG
 L K G E N Y R A T C V V A S Y F P H S S V K L R W Y K N A R
 1010 GAGTGGGACTTTACAACTACCTTAAGCGCTCAAGGCTTGGGTAGACGGGCTTAATCAAGGGAATCTCTACGGTGTCTATCCGGGT
 E V D F T K Y V T A S S V W V D G G L I T R I S T V S I P V
 260 GATCGGAGGAGGAATAGACCCAGTCTTCGCTCTAGCATAGACTGGTACAGGCAAGTATCATTTGCTCGCATGCCAAGCTGGA
 D P E E Y T P S L R C S I D W Y R D E V S F A R I A K A G

FIG. 2-1

290 ACACCCCTCTGTGTTTGTGCCCAAGCGTGTGCGTTTGGGTAGAAGCGGAGCGCGCTCTGTAGCGCTAAATGCTACCGACGCGG 1190
 T P S V F V A P T V S V S V E D G D A V C T A K C V P S T G
 320 GTGTGCTATCGTGGTCACTCAAGGACCACTACGAGCGGTTCCTGCCAAGACATGACAAGCGGAGTCTGCGCTAGCCACTGCGGATTC 1280
 V F V S W S V N D H L P G V P S Q D M T I G V C P S H S G L
 350 GTTAACATCGAAAGCGCGCGCTCTCAGACAGAAATGGGAGAGGAGTATAGCTGCGATATAGAGGGGTACCCGCGAGCGCGCTGCT 1370
 V N H Q S R K P L S E E N G E R E Y S C I I E G Y P D C L P
 380 ATGTTTCCGACACACTGGTATATGACCGCTCCCGGATTTGTGAGCAGCGCGGTTTTCGACGACATCATCGCACTTACTTCCGGGCGC 1460
 M F S D T V V Y D A S P I V E D R P V L T S I A V I C G A
 410 GCGGCACTGGCGGTGCTCTCATCACAGCGCTCTGTTTACTGCTGCAAGCGCTCACAGGCGCGGTACAGCAACTCTGACTTTTAC 1530
 A A L A L V V L I I A V C F Y C S K P S Q A P Y K K S D F -
 440 GCTGGAAGCGCTCTCCCGCAACAAAGCTATTTGTCAAACTACAGTTTGAAGCGCTGTAACACAGTACGTTGGGCTCCCAAGTGGTCC 1640
 GCATAGGCCAACCGTACGCCACAACTCACTCTCGCAATATGGCACTAAAATATGCGGTTATAGCGGCTAGTGCAAAACCGTGGGTT 1730
 GTGTACAACTCCGACCGCGGTATTTATAAAGCGATTATCTCTCGCGGTATACCGTGTCTCTATCGCGCGGTACGCTTAAGTAAAG 1820
 CAACATGGCAGGAGACCCACAGCGTGGATGGAAGATTATAAATTACTACAGCTGGAACCGCGC 1884

FIG. 2-2

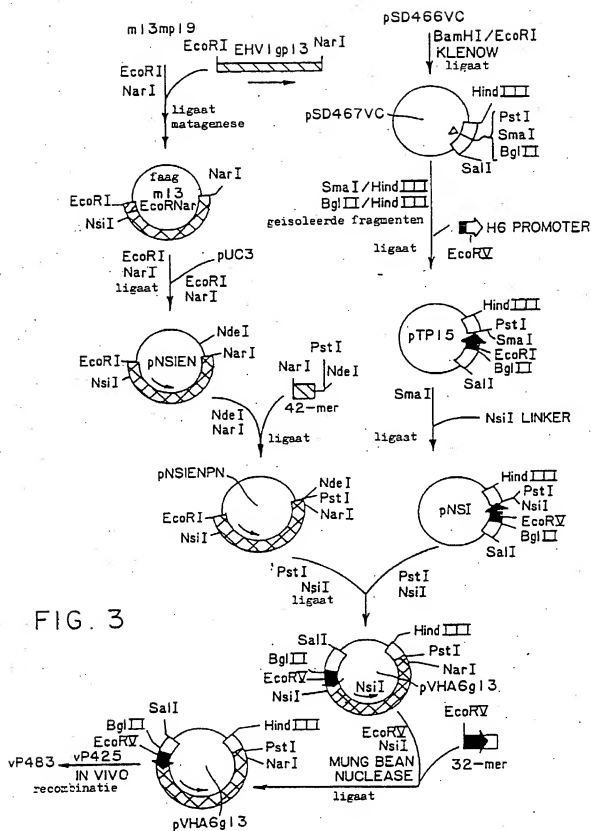
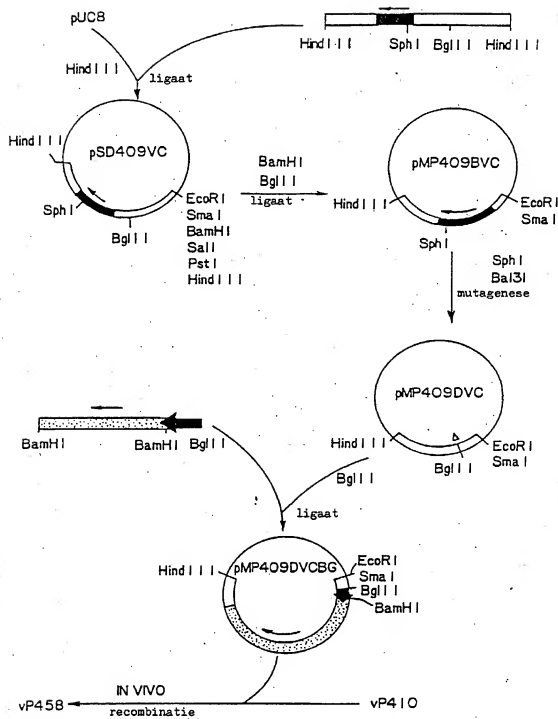


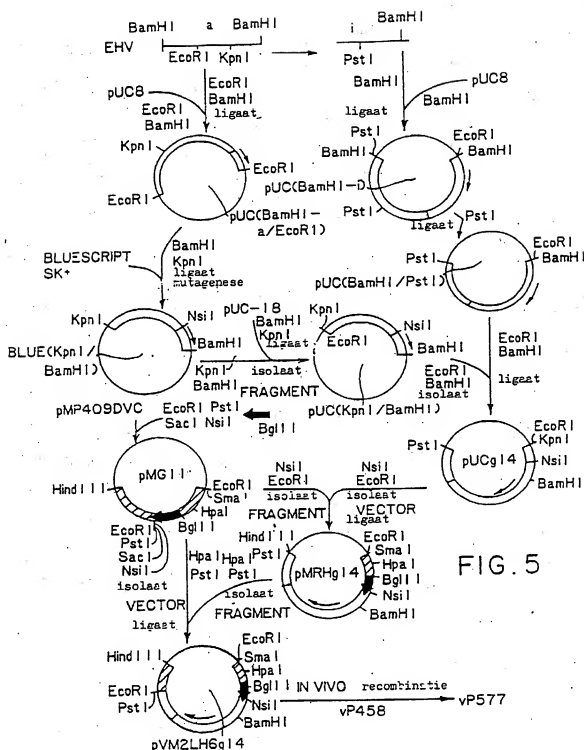
FIG. 3

0900034

FIG. 4



9900034



9900034

AACGTTGGGTTGTTACCGCATCTCAAGGAGGAAGTACGTCGGTTTATGATTACTGCGG
 114
 GCTAAAGGTAATTGGTCAATTAGCGAGTTTCAAAGGTTTTATTGCTTTGAGGGAGTG
 ACAGGTGTGACGGCCACGCGGGCTGGCGTGGAAATATATCGGGGAGCTCATCCTA
 228
 GCGCGCGCAGTATTCTCCTCGGTTTTTCCACTGTGGAGAGGTGCGCCTCCTGCGGGCA
 GATCGTACCTAACC CGGACTCCAGCGCGCACAGCGCTGCGTGAGCGGCATTACATA
 342
 ACCTACGAGGCGTCATGTCCTCTGGTTGCCGTTCTGTGCGGCGCTCCACATGGGGCA
 M S S G C R S V G G S T W G
 ATTGGCGCGGAGACGGTGGTGATTACGACAGCGACGTGTTCTCTCTCCTGTATGCA
 N W R G D G G D L R Q R R V L S P V C
 456
 GTGCTCCAGCAGCTGGCTCCTGGATCGGGAGCCAACTAGGCAATGTTGGAAACTTAC
 S A P A A G S W I G S Q L G N V G N L
 15
 TCGCCACCCCGCCCGCTGGGAAAGCGGCATCATCGAGGGTGGGCAACAATGTTT
 L A T P H P L G K P A S S R V G T I V
 570
 TAGCCTGTTTGTGCTTTTTTGAAGCTGTGTTGTAGAGCGCTACCCACCACGCCAA
 L A C L L L F G S C V V R A V P T T P
 53
 GCCCCCCAACTAGTACTCCCACTTCCATGTCAACGCACTCCCATGGGACAGTAGACC
 S P P T S T P T S M S T H S H C T V D
 684
 CTACGCTGCTCCCCACAGAAACGCGGACCCACTCAGACTGGCTGTGGCGGAGTCCG
 P T L L P T E T P D P L R L A V R E S
 91
 GTATACTCGCTGAGGATGGAGACTTTTACACCTGCCACCGCTACCGGATCCACCG
 G I L A E D G D F Y T C P P P T G S T
 798
 TCGTACGCATCGAACACCTAGAACTTGCCCAAGTTTGACCTTGGGAGAACTTCA
 V V R I E P P R T C P K F D L G R N F
 129
 CGGAGGGGATTGCTGTTATTTTAAGGAAACATCGCTCCCTACAAATTCAGGGCAA
 T E G I A V I F K B N I A P Y K F R A
 912
 ACGTATACCTAAGGACATCGTTGTAACACGTTGTGTGGAAAGGATACAGCCATACGT
 N V Y Y K D I V V T R V W K G Y S H T
 167
 CCCTGTCCGACAGATACAATGACAGGGTTCGGGTTTCCGGTGGAGGAGATCTTCGGTC
 S L S D R Y N D R V P V S V E E I F G
 1026
 TCATCGCAGTAAGGAAAAATGTTTCGTCAAAGGCCGAGTACCTCAGAGATAACATCA
 L I D S K G K C S S K A E Y L R D N I
 205
 TGCACACGCGTIACCACGACGACGAGGACGAGGTGGAGCITGATTGGTGGCGCTCCA
 M H H A Y H D D E D E V E L D L V P S
 1140
 AGTTTGCAACTCCGGGGGCCAGAGCCTGGCAGACCACCAACGATACTACGTCTTACG
 K F A T P G A R A W Q T T N D T T S Y

FIG. 6-1

9900034

243
 TGGGGTGGATGCCATGGAGGCACTACACCTCAACGCTGTGCAACTGCATCGTCGAGG
 V G W M P W R H Y T S T S V N C I V E 1254
 AGGTGGAGGCGGGTCCGTCTACCCCTACGACTCCTTCGCCCTGTCCACCGGTGATA
 E V E A R S V Y P Y D S F A L S T G D
 281
 TTGTGTACGGCTCTCCGTTTACGGCCTGAGGGCTGCCGCTCGCATAGAGCAATA
 I V Y A S P F Y G L R A A R I E H N 1368
 GCTACGCGCAGGAGCGTTTCAGGCAAGTTGAAGGCTACAGGCCCGCGACTTAGACA
 S Y A Q E R F R Q V E G Y R P R D L D
 319
 GTAAACTACAAGCCGAAGAGCCGGTTACCAAAAATTTTACTACTACCCCGCATGTCA
 S K L Q A E E P V T K N F I T T P H V 1482
 CCGTCAGCTGGAAGTGGACCGAGAAGTTCGAGGCGGTGTACGCTGACCAATGGA
 T V S W N W T E K K V E A C T L T K W
 357
 AAGAGGTGCGAAGCTGTCAGGGACGAGTTCGCCGGCTCTCAGATTACTATTC
 K E V D E L V R D E F R G S Y R F T I 1596
 GATCCATCTCGTCTACGTTTATCAGTAACACTACTCAATTTAAGTTGGAAGTGC
 R S I S S T F I S N T T Q F K L E S A
 395
 CCGTTACTGAATGTGTATCCAAAGAAGCAAGGAAGCCATAGACTCGATATACAAA
 P L T E C V S K E A K E A I D S I Y K 1710
 AGCAGTACGAGTCTACGCACGTCITTAGCGGTGATGTGAATATTACCTGGCAGGG
 K Q Y E S T H V F S G D V E Y Y L A R 1824
 433
 GGGGGTCTTAATTGCATTACAGCTATGCTCTCCAACGAAGTCCGAGGTGTACC
 G G F L I A F R P M L S N E L A R L Y
 471
 TGAACGAGCTTGTGAGATCTAACCGCACCTACGACCTAAAAATCTATTGAACCCCA
 L N E L V R S N R T Y D L K N L L N P
 509
 ATGCAAAACAATAACAATAACACCGCGAAGACGCGAGGTCTCTCCTGTACGTACGAG
 N A N N N N N N T T R R R R R S L L S V P
 547
 AACCTCAGGCAACCAAGATGGTGTGCATAGAGAACAATTCTACATCGCTTGCACA
 E P Q P T Q D G V H R E Q I L H R L H
 589
 AACGAGCAGTGGAGGCAACGGCAGGTACCGATTCTTCCAACGTCACCGCCAAACAGC
 K R A V E A T A G T D S S N V T A K Q
 627
 TGGAGCTCATCAAAACCAAGTGTGTATCGAGTTTGCCATGCTACAGTTTGCAATAG
 L E L I K T T S S I E F A M L Q F A Y
 665
 ATCCATCCATCCACGTCATGAAATGCTAAGTAGAATAGCAACTGCGTGGTGTGA
 D H I Q S H V N E M L S R I A T A W C
 703
 CCCTCCAAAACAAGAGCGGACCCATGGAACGAAATGGTGAAGATTACCCGAGCG
 T L Q N K E R T L W N E M V K I N P S

FIG. 6-2

0900034

280
 CCATAGTCTCCGCAACCCCTTGACGAGCGAGTTGACGCGAGGGTCTGGGGGACGTGA
 A I V S A T L D E R V A A R V L G D V
 2280
 TAGCTATAACGCACTGCCCAAAATAGAGGGCAACGTTACTTGGAAAACTCCATGC
 I A I T H C A K I E G N V Y L Q N S M
 623
 GCTCGATGGACAGTAACACGTGCTACTCCCGCCCCCGCTAACATTACAATTACTA
 R S M D S N T C Y S R P P V T F T I T
 2394
 AGAATGCAAAACACAGAGGGTTCGATAGAAGGCCAGCTGGGAGAGGAGAACGAGATT
 K N A N N R G S I E G Q L G E E N E I
 661
 TCACGGAGCGCAAGCTGATCGAGCCGTCGCCCTCAATCAGAAGCGCTACTTTAAGT
 F T E R K L I E P C A L N Q K R Y F K
 2508
 TTGGCAAAGAGTACGTTTACTACGAGAACTACACGTTTCGTCCGCAAAGTGGCCCGCA
 F G K E Y V Y Y E N Y T F V R K V P F
 699
 CGGAAATCGAGGTATCAGCAGCTACGTTGAACCTTGAACCTTTGGAAGACC
 T E I E V I S T Y V E L N L T L L E D
 2622
 GCGAGTTTCTGCCCTGGAGGTGTACACGGGGGTGAGCTGGAGGACACCGGCTGCG
 R E F L P L E V Y T R A E L E D T G L
 737
 TAGACTACAGCGAAATACAGCGCGCAACCAAGCTCCAGCTCTCAGGTCTTACGACA
 L D Y S E I Q R R N Q L H A L R F Y D
 2736
 TCGACAGCGTGGTCAACGTCGGACAATACCGCAGTGATTATGCGAGGGATCGCCAGCT
 I D S V V N V D N T A V I M Q G I A S
 775
 TTTTCAAGGGCGTGGTAAAGTGGGGAGGCGGTGGGAACGCTCGTTCTCGGCGCGG
 F F K G L C K V G E A V G T L V L G A
 2850
 CGGCGCTGTTGTTTCAACCGTATCTGGAATAGCTTCGTTTTTAAACAACCCATTG
 G A V V S T V S G I A S F L N N P F
 813
 GGGGGCTAGCCATCGGCCTGCTGGTAATCGCGGGCCTGGTAGCTGCGTTTTTGGCT
 G G L A I G L L V I A G L V A A F F A
 2964
 ACAGATATGTAATGCAGATCCGCAGTAACCCCATGAAAGCTCTATACCCCAACAAAT
 Y R Y V M Q I R S N P M K A L Y P I T
 851
 CAAAGCGCTTGAACCAACAAAGCCAAACTTCTACGGCCAGAACGAGGAGGACGATG
 T K A L K N K A K T S Y G Q N E E D D
 3078
 GGAGCGACTTTGATGAGGCCAAGCTTGAAGAGGCTCGCGAAATGATCAATACATG
 G S D F D E A K L E E A R E M I K Y M
 889
 CTATGTTTTCGGCCCTGGAAGAGCAGGAAAGAAAGCTATAAAGAAAAACAGTGGGG
 S M V S A L E K Q E K K A I K K N S G
 3192
 TTGGCTGATCGCCAGTAACGTTCTCAAAGCTGGCCCTCGGAAGCGCGGTCCCAAT
 V G L I A S N V S K L A L R R R G P K
 927
 ATACCGGACTCCAACAGAACGATACCATGGAATAAAGAAAAATGGTTTAAACATGT
 Y T R L Q Q N D T M E N E K M V
 3306
 TAATAAATATTATGACACGTACTCAAAGTGTGACCTCATATTTGCATAACCACTTTC

965

TAGTTCCGGCCCCAAGGATATTAAAGCCTAGTATCTCGCGCGAGG

3351

FIG. 6-3

9900034

8800034

FIG. 7

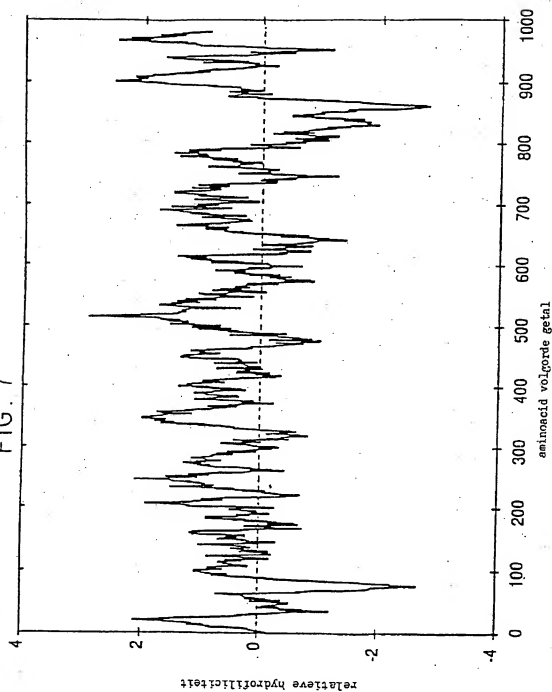
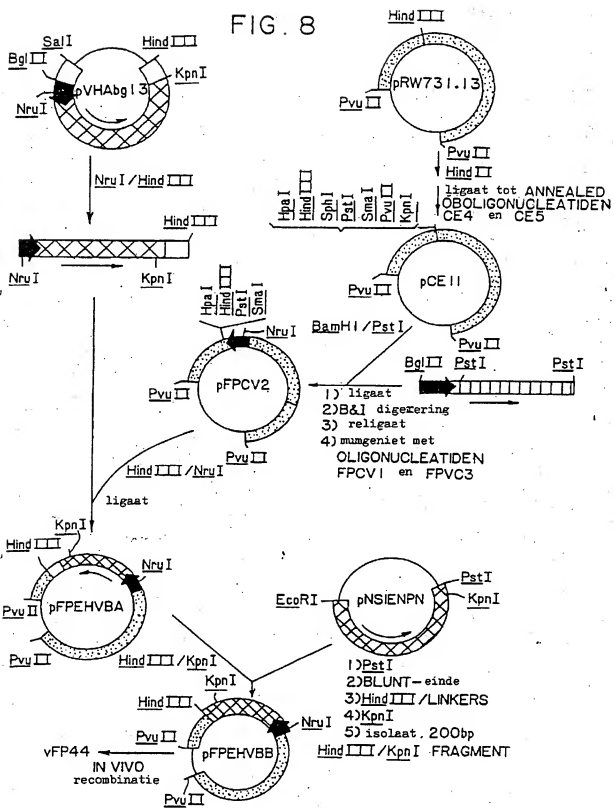


FIG. 8



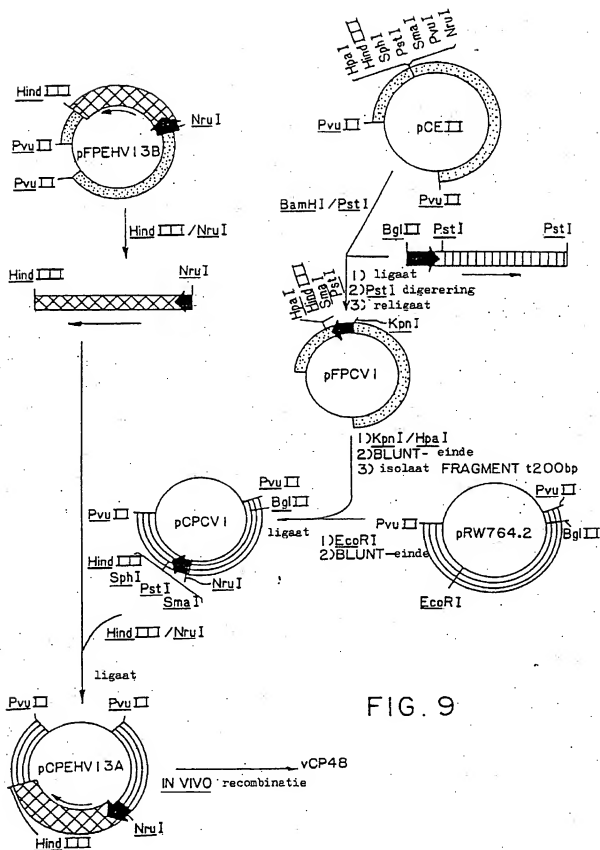


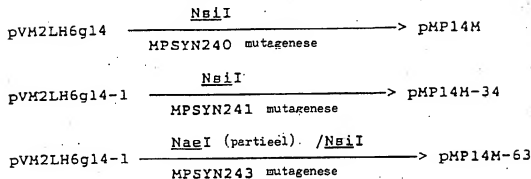
FIG. 9

8400034

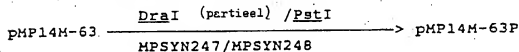
FIG. 10

Constructie van plasmiden die EFV-1 op 14 bevatten

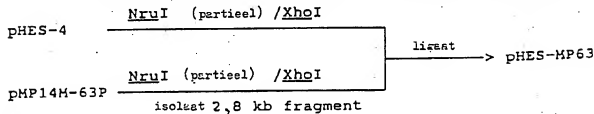
Modificatie van het 5'-uiteinde van EFV-1 op 14



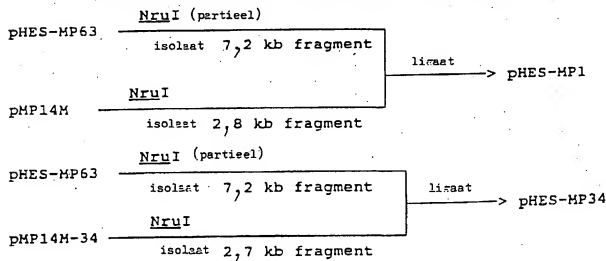
Verplaatsing van vreemd EFV-1 DNA



Verplaatsing van de H6 promoter/EFV-1 op 14 naar het pES systeem



Verplaatsing van de op14 leider met verschillende lengten



9900034

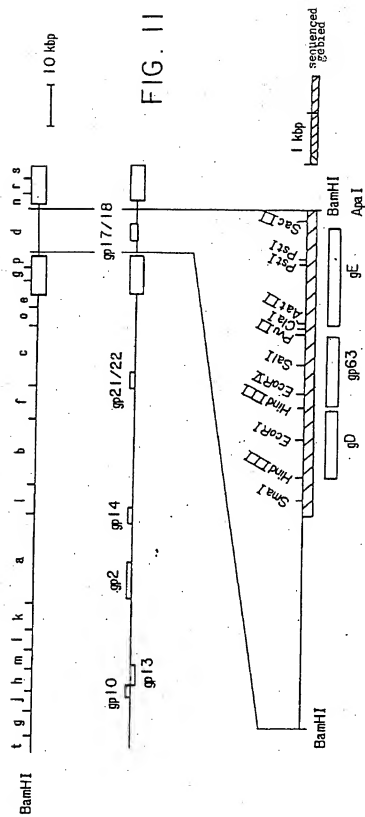


FIG. 12-1

1 CAGGGGTGGTGGGTAGCCTCAGGGGGTCACACACACACACCCAGACGGTTTGACTCCTTCTC
69 CAGACGACACCTATGACGATACAAATCACCTAAGGTAGGACAAATTCATATAGAGATCGTGCCTCAGC
137 TCCGCCAGACCGACCCCATATAGAGCTGGGGAGGGGACTCTCAGAAAAAACTTTATGGAGGGGTCC
205 TGTACTGTGGAGACTAACTCAGGCTTGGCGATTTTTGGAAAAATCGGCAAGCCAGCGTAGACGGGTT
273 TAATCGGGAACTACTCATATACGGCTGATGCGCAATGGGGTACGGTTTACGCCCTCGTATCTACGC
341 TTACAGTTCCGTGGTTAAATGTTATTCCACTAACAAAAATTAATTGCGGTGCTTGCCCCACGAACTTA
409 GTGCGCGCGGATGGGAGGACCTCAACTCATGTACCACCAATCAACCAATACCGTGTCCGGGGCCA

477 ACAGCGCACCCATATTTTTTCTCTGCGAAGGCGACAGGGCTGTGTATCACATCAGAACTGGTGT
 545 CCCAGCCCAACATAACTTGGTCAGTTGGATCAGATAGGTTGCCGTACGATGGATTTTCTCAGACGTGG
 613 TATGGAATACAGCCCGGGGTGTGTGGTATACTGCGCAGCAGGTTCCATTCACCGCACCACTGGCGC
 Sma I
 681 TTGGATCAACATCAAGGACTATCTCTGTGAGGCTCAGCGCATCGGACTCAAAGACGAGCGGATTACAA
 749 AGTGCTACCCAGGCCCACTCAACTTCCAACTTCGCTTTAGTGGTGCAGCCAGCTTAACAGTGCACAA
 817 TTTATGCCCTGTGCTGCTTGTACTGTATGTAAACCGGCCCGAGCGTCTGTATATTAACTCAAA
 885 AATTATCCCTTGGCCTTTACACACAGTGGTGGCGTGTATGCAGAACGGTGCCACCGCCCTGGTACGTT

FIG. 12-2

FIG. 12-3

HindIII

953 TTTTCAATAACGAGCATGCTACCTTCAGCTTATGATGGATGGACGTTGGTTTGGCCATGGC
 M S T F K L M M D G R L V F A M A

17

1021 AATCGCGATCTTGAGCGTTGTGCTCTCTTGTGGAACATGCCAGAAAGCCAAGCGTCGGTTCGAGGAC
 I A I L S V V L S C G T C E K A K R A V R G

59

1089 GCCAGGATAGGCCAAAGGAGTTTCCACACCCCGCTATACTATACAAATTTTAAACAGATACACGCCG
 R Q D R P K E F P P P R Y N Y T I L T R Y N A

82

1157 ACTCGGCTAGCATCACCGTTTATTACGACCAAGTTAAATAATGTTGACTTGGCGATTGTTACTGCTAC
 T A L A S P F I N D Q V K N V D L R I V T A T
 **

105

1225 GCGCCCATGTGAAATGATAGCGCTGATCGCTAAGACAAACATAGACTCAATCCTGAGGAGCTGCGCG
 R P C E M I A L I A K T N I D S I L K E L A

127

1293 CTGCCCAAAACTATTTCGGCCAGACTCACCTGGTTTAAATAATATGCCAAGGTGCAACGCCCTATA
 A A Q K T Y S A R L T W F K I M P T C A T P I

150

1361 CACGATGTTAGTTATATGAATGCACCCCAAGCTATCATTTGCAATGCTGTCATGAGAGATCAGACAT
 H D V' S Y M K C N P K L S F A M C D E R S D I

173

1429 ACTATGGCAAGCTACTTTTAATTACTATAGCGTGTGAAACTGACGATGAACCTGGACTTGTACTGGCAG
L W Q A S L I T M A A E T D D E L G L V L A 195

1497 CCCCTGCACATTCTCCCTCGGACTGTATCGCGGTGTATAGAAATCGACGGAAGCGAATTTACACG
A P A H S A S G L Y R R V I E I D G R R I Y T 218

1565 GACITTTCTGTAACTATTTCCCACTGAACGGTGTCCGATTGCTTGACCAAACTTTGGCAATCCGGA
D F S V T I P S E R C P I A F E Q N F G N P D 241

1633 TCGGTGTAAACTCCAGAGCAGTACTCGCGGGGAGAGAAGTTTTTACACGCTCGGTTTCTTGGTGAATCA
R C K T P E Q Y S R G E V F T R R F L G E F 263

1701 ACTTCCCAAGGAGAGCATATCAGATGGTTGAAGTTCTGTGTTGCTCTACGATGGTGGAAACCTACCA
N F P Q G G E H M T W L K F W F V Y D G G N L P 286

1769 GTGCAGTTTTATGAGCCCGAGGCATTCCGAAGACCCCGTCCCTCGGATACCAACCCCTGGATTTCATT
V Q F Y E A Q A F A R P V P P D N H P G F D S 309

1837 TGTTCAGTCGGAGATTACACAAATAAACAGACCCCGAACCAGCCAGCGGAGACCCCAACCCCATC
V E S E I T Q N K T D P K P G Q A D P K P N 331

1905 AGCCTTTTAAGTGGCCAGCATCAAAACATTGGCCCCAAGACTCGATGAGGTGGATGAGGTCTAGAG
Q P F K W P S I K H L A P R L D E V D E V I E 354

FIG. 12-4

FIG. 12-5

1973 CCGTAAACAAGCCCCCAAAACGCTTAAGAGCACTTACGTTTGTGGGCATCAGCGTCGGTTGGG
P V T K P P K T S K S N S T F V G I S V G L G 377

2041 TATCGCGGCTAGTATTGGTGGCGTCATTCTATACGTCCTGCTTGGTCGGAGAAAGAACTGAAA
I A G L V L V G V I L Y V C L R R K K E L K 379
 I A G L V L V G V I L Y V C L R R K K E L K

2109 AGTCTGCACAGACGGCTTGACTGCGCTACGCTCGACCTTTAAGGATGTTAAATATACCCAGCTTCCG
K S A Q N G L T R L R S T F K D V K Y T Q L P 402
 K S A Q N G L T R L R S T F K D V K Y T Q L P

2177 TAACAGTGTGGTAACTCTGTTGGAGGTGTCACGGCCTTAAGCTTCGCGCTTGGAGATATAAC
 --- HindIII

2245 GCACACCTACACAACCGGCACACAGCAGTAGTAGTCGCTATGGCCAACTCACTCGGATGTTGAG
M A K L T G M F S 9
 M A K L T G M F S

2313 CGCTGCGATATTACTGTCTATGGCTATATGCTCAACCGCAATCATATATCGCGGAGAACATATGACA
A A I L L S H A I C S T A I I Y R G E H M S 31
 A A I L L S H A I C S T A

2381 TGTACCTAAACCGCAGCTCTGAGTTGCGGTACCCCACTGATCAGTCCCTGTTTGGTTGGCCAC
M Y L N A S S E F A V Y P T D Q S L V L V G H 54
 M Y L N A S S E F A V Y P T D Q S L V L V G H

2449 TTGCTCTTCTCGACGGACAAAGCTTACCCACCAACTATAGTGGCTGATCGAATTGATTCATTA
L L F L D G Q R L P T T N Y S G L I E L I H Y 77
 L L F L D G Q R L P T T N Y S G L I E L I H Y

2517 CAACTACTCCAGCGTTTCTACACTGTTATCCAAAGCATATCGTATGAATCATGCCGGGTGAGCCA
 N Y S S V C Y T V I Q T I S Y E S C P R V A

 99

2585 ACAATGCTTTACAGTCGTGCGCTCCACAAAACCTTCTAAGCACTACCAAGCACTATTTCCGAGTCATGCC
 N N A F R S C L H K T S K H Y H D Y F R V N A

 122

2653 TCCTGTTGAACCAAGGTTCTCTTAACAATCACAAGCCACAGCCTACAGATTCGGGGGGGTATATCCT
 S V E T N V L L N I T K P Q P T D S G A Y I L
 **

 145

2721 TCGGTAACACTTGACCAAGCGCGCCACGAGATGTTTTGGAGCTTCCGCCCTTTGTTACGATCAA
 R V K L D H A P T A D V F G V S A F V Y D L
 167

2789 AATCTAAACGGTCCCGCATCCAAATGCCACCAACCAACGGTACAGCTACACAGCACTATGTCTCG
 K S K T V P D P H P T T Q T V E P T T S Y V S
 190

2857 ACTCCCACTACGACTATACCGATGAGTAAACCCAGAACTGAATCCACATCAACATCTACCCAAACA
 T P T Y D Y T D D V T T E T E S T S T Q Q
 213

2925 GGCATGACCTCCACTCAAAACCGCTAGCGCTACATGGGACCCAGCTAACCCACAGAGCTGCCGACAA
 A H T S T Q T P S A T W G T Q L T T E L P T
 235

FIG. 12-6

FIG. 12-7

2993 AGAAGACTGTGTTATGGTGGAGGCCCTGTATGCCATTGGTTCAGCCCATCGACAGGGTCCG
 N E T V V I G Q E A L L C H W F Q P S T R V P
 ***** 258

3061 ACCCGTATCTGCATCTGTTGGAGCAGCTGGCAATCTCCCGAGATGTTCTACTGCTCGAAGACTC
 T L Y L H L L G R T G N L P E D V L L V E D S
 281

3129 TGAGTTCTCTGACACATGCGCTGACATAGCCCTTGACATCACCCGCTGACGGTGATGATTTA
 E F L R T T S P A H R P S A S P A D G D D F
 303

3197 AACAGACAACTCACTTCCTTAAGGCGCGACACAGATCGTCGAAATGGTGTATCCGACCGCG
 K Q T N S T. S L K A R N K I V A M V V I P T A
 ***** 326

3265 TGTCTACTATGCTCTCTGTGGTGGTGTGCGTCGCATCATMAACGGTGGCGCGCAACATTATTT
 C V L M L L L V V V G A I I N G A V R K H L L
 349

3333 GAGTTGCCGACGCCGAGATCTACCCCTCCGACAGGGGGCGCATCGGGCGGACGAGAGCGGCG
 S C A S R R I Y R S G Q G G A S A A E R R R
 371

3401 TGACTTGGGCTCCTACTTNAAGCCGCTATCGGAGTCCGTGCGCGACATACAACCTCATCTACCTC
 L T C G P T L A A S S E S L A D D T T V I Y L
 394

3469 CAAACCCCAACCTTGCAGAGAAACAGAGTTGAGAGCCGATCGCTTATGCAACAGCTGAAACCGGAA
 Q P P N L R R K P S W R P I R L W N S ---
 PvuII
 413

3537 CTGAGGGCCATCAAGACGAATCATAGCTTGTGGGGTGAATGGGCTTGGTATTAAGTTTCTGTATTA

Clal

3605 TCGATTTTATATTATTAATTTGCAACATRAACATCTTGTGCATGTTTACATATTATTGTCATT

3673 GGGACGGTCCACTGGGAGGTGGTACAACTCGGGTTTAAAGCTCTCGATGTTTGGTAGGAACATCACAG

AatII

3741 TTCTCCACTTTGGCGTCAAAAGCAATCAGACGCTCTAATTGGAAGTAGAACCTCACATGGAGCTGTGG
M E L L 4

3809 CCGCAAGTCGGCTTGTATATTTTTTGGGCTAGTAACAGTACTCGATGCGTGGGAGTCCAAACAGTT
A A S R A C I F F G L V T V L D A W G V Q Q 27

3877 GAACTTTCGAGGGGCTTGGGCTATGATCGACGGAAGGGAGGTTTTAACCCCTACTAACACAACTAC
E L S E G A W A M I D G R D V L T P T N T T T
***** 50

3945 TCGGTCACAAAGGCTTGGACGTTTTTGGAAACCCCTCCGCTTGGCTGGCGCACATATCACTTAAGA
R V T K A W T F L E T P P G C A G D I S V K 72

4013 AGGTGTCCGTAGCCATAGTCTGTGCGAAGATAACATTATAATAGCAAGCACTGTAACTCTTAAC
K V C V S H S L C E D N I I I G K H C N L L T 95

FIG. 12-8

FIG. 12-9

4081 GGGGRACATGGCATTGGTTGGCGGAGTTTACGTAGTAGTAACGGATCGCTCGGCAGACAGACGAGTGT
G E H G I A L A E F N V V N G S L R R T D D V

118

4149 GTACTTTGTGAATGGTACAGTCTTTCCCAATCCTTGCCGAAACCGCGAGCGTCTCACAAATCCATAGGG
Y F V N G T V F P I L A E T R S V L Q I H R

140

4217 CAACCCCTCTATCGCAGGGGTTTACACCCCTCCACGTTTCCATCGAGCGGATGATGAACACTCCGTC
A T P S I A G V Y T L H V S I D G M M K H S V
163

4285 GTGCTGCTACCGTCAAGAGCGGCCCAACCAACCGCAACCGCTTGGCGGTTAAGACCC
V L L T V K K P P K Q P Q P Q P R L R V K T P
186

4353 GCCACCGGTAAACCGTTCTCTCAGGTTCCCGTAAAGACCCACACGAGTTTGTGGTGCACGGATACCACT
P P V T V P Q V P V K T H T D F V V H G Y H
208

4421 CGCGCGTGTACCGTGAATCGGAATCTTTCGAGCTGTGCGTGAACCTGGAGTCACATATCGTAGAGCC
S R V Y R D G E S F E L S V N L E S H I V E P
231

4489 AGCTTCAGCGGGAGATTCAGTGGTACTATATGATACATCATCTCATCGCATCGCATCTATTTCGAGT
S F S A E I Q W Y Y M N T S S S C D L F R V

254

9900034

4557 TTTGGAACCTGCATCTTACACCGACAGCATGGCTGCTCACC CGGACAAACACACCTGCAGCT
F E T C I F H P T A M A C L H P E Q H T C S 276

4625 TCACATCCCCCATCAGAGGACCAAGATCCTACACCGGGTGTATGGAACCTGCAGCGCATCATGGAAAT
F T S P I R A T K I L H R V Y G N C S D H G N 299

4693 TCGTGGCCTTCTAGGTGCCATAGCACCTCTGCTGGGCATCGTCTATACITTTATTCARCCAGCACAGAA
S W P S R C H S T L L G N R L Y F I Q P A Q N 322

4761 CAGATGGACCTGTTGTTCAAGACACTCCCGCGTGGCTACCGGGCTGTATGTGTTGTATTATTGT
R V D L L F K D T P A S A T G L Y V F V L L 344

4829 ACAACGGACATCCGGAGGCGTGGACGTATACGCTGCTGTCAACCGCAATCACITTTATGAATGTGCTT
Y N G H P E A W T Y T L L S T A N H F M N V L 367

4897 ACTGACGTGACCCGCCACGGCTAGGAGACACTTTTATACGGACCTCGGCACAAATCATCTACTCC
T D V T R P R L G E H F Y T D L G H K I I T P 390

4965 TCATCCATCTGTAGTACACATGACAGATTGGAGCTTGGAGCTGCACACTACCTCGCCCTTTTGTGTGG
H P S V A T T E E L G A W T R H Y L A F L L 412

5033 TTATATCTGCACGTGCGGGCGCTGCTAGTTGCATTGGTGGTGGGGCTGATTCTCTACATCCGA
V I I C T C A A L L V A L V V W G C I L Y I R 435

FIG. 12-10

FIG. 12-11

5101 AGCAACCGTAGCCGTATGAAGTCTGAACCCCTTTGAACGCTTTACACGAGCTTCCACGCAACGA
S N R K P Y E V L N P F E T V Y T S V P S N D 458
 5169 CCCCTCGGAGAGGTCCTTGCTGTTTGAGCGCTAGCTTCGGACTCTGACGACTCCTTCGACTCTGATT
P S D E V L V F E R L A S D S D S F D S D 480
 5237 CAGACGAAGAGTTGGAATCCCACCACTCCCAACACGACTCCACAGCTCCCACCATACCAGTTTGTAT
S D E E L E Y P P P P K P A P Q L P P Y Q F V 503
 5305 GACGGGGGAGACCCCTAGCGCAGGTCGGGANTCAAGTTTGGTTCCGCGATACACCCGAGGCTC
D G G D A P S G R S G F K V W F R D T P E A S 526
 5373 CCCGGTTCCTCTTCATAAACCAAGCTACAGGTCACAGACTACAGCCGGGTAGCGTCAAGCTAAGT
P V P L H K P T L Q G P D Y S R V A S K L K 548
 5441 CGATACTAATGACGACGCAACACGCGATACACAGAGTCTTCGCGGGGAGTCAACTATGCCGAGGAA
S I L K --- 552
 5509 TCGCAAGCTAAGCAACCCCTGTGAGAAACAGCACCTTTCAGAGTATCTCGCCGTAAACGGCGGTTA
 5577 TCCAGATCGGGCTCAACCTCCGANTCCGACGAGGACTACACAACCAAGTCAAAAGTACGAGTCAGATG
 5645 TCAGCGAGTTTAAAAAATGATGGATCTGGAAACTCTACCTCCCCCAAGGCTGAGCCGCAAGCTCAG

5713 AAGCCGAGSCCTGATGCTGCGAAGTAGGAGCCAGTCAGCACACCTAGCTACATCTTTAAACGAATGGGT
 5781 GGCTCCTATGATTGGCATTTTCTGGCAATGTGTATGTATGAGTTGCTTTTCAAAATAAAAAACAACAT
 5849 TAACCCCTGTAAACATCCGTTTGTCTACTCTGTATGATAGAGTTAAACCCACCCCTAGAGAGTTATGT

Sac II

5917 ATTTAATCCCTGGGACCCGCGGAAGTCATATATCCCTCGCCCCCTCATTTGGCGGCACATTGSCCT
 5985 GCCCGGCGCAGTCCTTACTCCCTTAGCTCGCCCTCTTGCCATAAGATAAACTATTTCCCTCCCAGCTAG
 6053 TTTCCACCACCAAGATTAGCGAGGTTTCCCTCTCAGCGATCAGTTTTCACACCCGGAAGAACAGGCC
 6121 TCATCGGTTTCCCTCGGTGTTTTCCCATCCATCTATCCAACCACTACATTTTCATGAGAGAGCGGAG
 6189 GCTGCCGAGTTGTTATACCCCTGTGAGTTTCCAACCCAGCTACCGTGGAGCGGTATGTCCGACCA

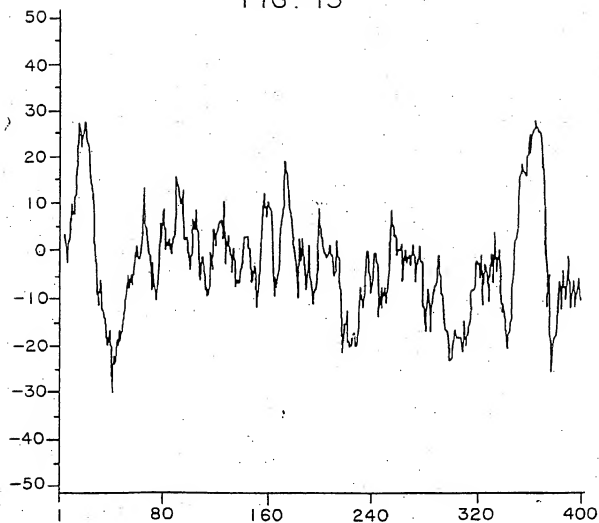
Pat I

6257 AGAAGTAGCGAAGAACAAATCTCTGGAGATGCCTGGGTGCTGCAGCAATGGCAGCGCAGAGGGGT
 6325 GGCTCGTCCCGCTACCTCCACCGAATTGATAACACTAACGACTACACGTACACCGCTGCTTCTGAGA

BamHI
 6393 ATGGGATCC

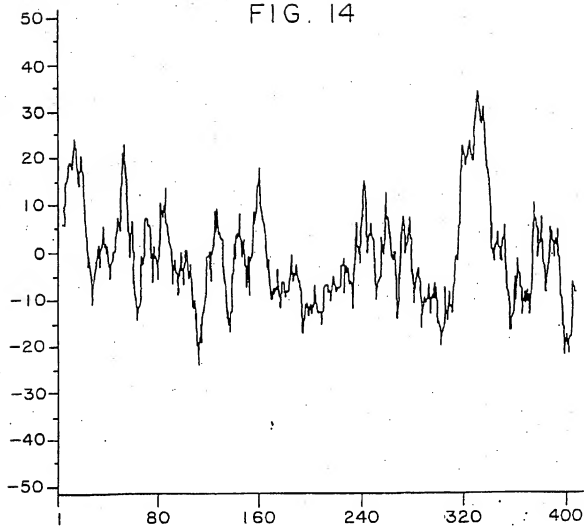
FIG. 12-12

FIG. 13



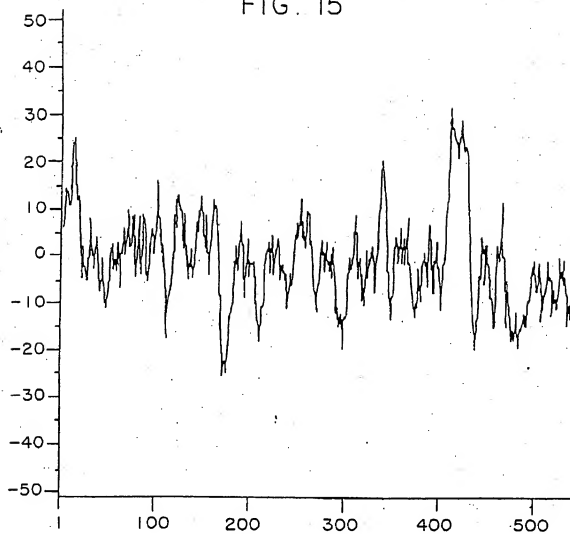
0500034

FIG. 14



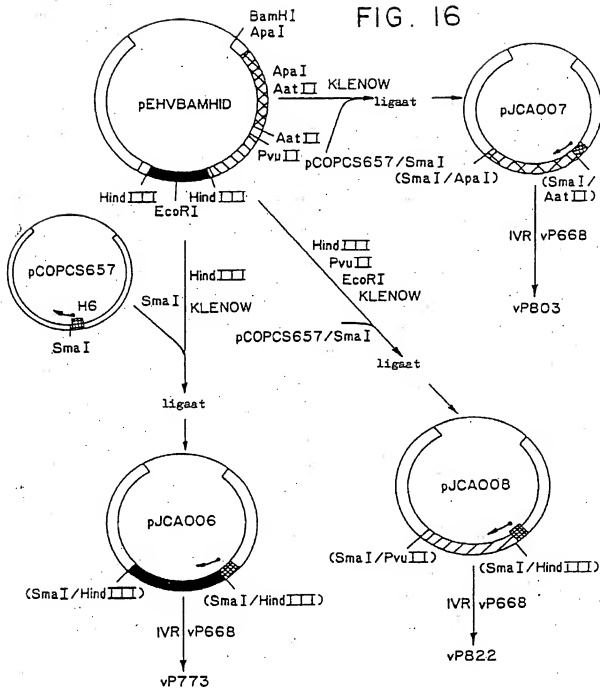
9900034

FIG. 15



000034

FIG. 16



9900034

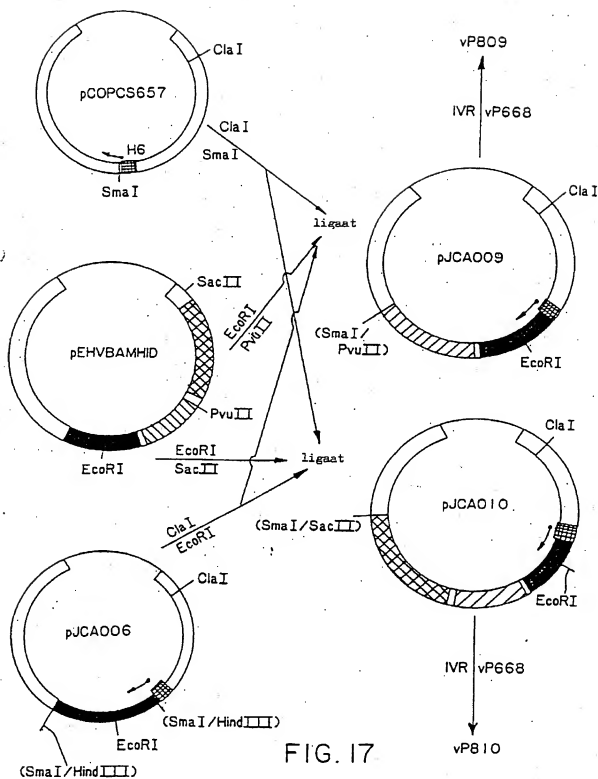
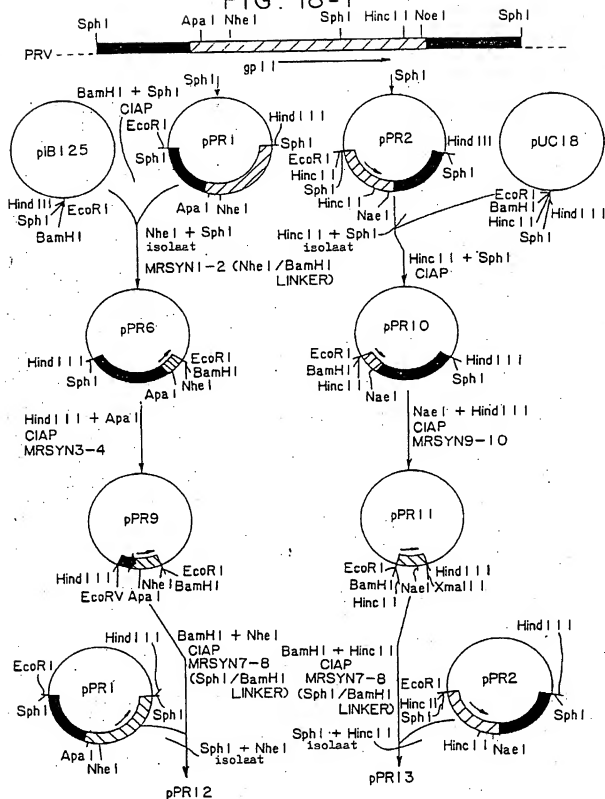


FIG. 17

00034

FIG. 18-1



9900034

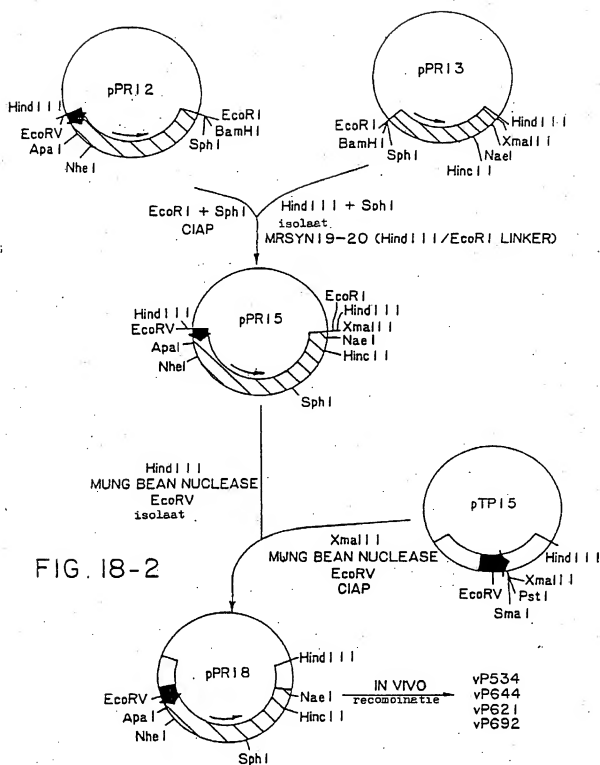


FIG. 18-2

000034

FIG. 19-1

AACGTGGCTCCTTGGCCGACCTGAAGGAGGCTGGCGCGCTTCATGGTGGCCCGGATGGTGGCTCAGCGAGGTCCCGGCTTACCG 90
 180
 CTTCCAGACGGCGCGTAAACGCCACCCAGCGCAGGCTGGCGATATATCCGCGAGCTGGTGGCGGGTTGCAGTCTTCAGGTCCGT
 270
 CTTCCACTGGCGGACGTCGAGGTCTCTCCGCGGATCGCTTCGCGCGACGCGGCGTGTACTGACCTACGAGGCTCATGCCGCT
 M P A
 360
 GGTGGCGGTCTTTGGCGGCGCCCGGCGGCAATCGGCCCGGACACACGCGGTGCTGGCTTCGGAGTCTTTGGCTTGCACACCAC
 G G L W R G P R G H R P G H G A G L G R L W P A P H
 450
 GCTGCAGCTGGCGGCGCGCTGGCGCTAGCGCTGCTGCTGCTGGCGCTCGCCGCGGCGCCCGCGCGGCGGCGCGCGCTGACGCGG
 A A A R G A V A L A L L A L A A A P P C G A A V T R
 540
 GCCACCTCGGCTCGCGAGCGCGGCGGCGCCACCCCAACGAGCTCTCCGCGAGGCGTCCCTCGGGGAGATCGAGGCGTCTCC
 A T S A S P T P G T G A T P N D V S A E A S L G E I E A F S
 64
 CCGCGCCCTCGGAGGCGCCGACGCGAGTACGCGACCTGGACGCGGCGCGCGCTCGCGCGCGCGCGACCGAGCGCACCGCTTC
 P G P S E A P D G E Y G D L D A R T A V R A A A T E R H R F
 720
 TACGTCTGCCGCGCGCTCGGCTCCAGGTTCCAGGTTGGAGCGCGAGCGGCTGCCCGCGAGTCTCGCAGGCGCGCACTTCAGG
 Y V C P P P S G S T V Y R L E P E Q A C P E Y S Q G R N F T
 810
 GAGGGGATCGCGCTCTTCAGGAGAACATCGCCCGCACAGTTCAAGGCCACATCTACTACAGAACGTCATCGTCAGCAGCGTG
 E G I A V L F K E H I A P H K F K A H I Y Y K H V I Y T T V

154 TGGTCCGGAGCAGTACCGGCCATCACGACCGCTTCACAGACCGGTGCCGTGCCGTGCAGGACATCAGGACGTGATCGACCGC
900 W S G S T Y A A I T N R F T D R V P V P V Q I T D V I D R
184 CCGGCAAGTGGCTCTCCAAAGCGGAGTACGTGGCGCAACACACAGGTGACCGCTTCGACCGGACGACGACCCCTCGAGGTGGAC
990 R G K C V S K A E Y V R N H K V T A F D R D E N P V E V D
214 CTGCCCCCTCGCGCTGACGGGCTGGGACCGGGCTGGCACACGACGCTACCAAGATCGGGCGCGGGGCTTCTAC
1080 L R P S R L N A L G T R G W H T T N D T Y T K I G A A G F Y
244 CACACGGCACCTCCGTCACTGCATCGTCGAGAGGTGGAGCGCGCTCCGTGTACCCCTACGACTCTTCGCCCTGTCCACCGGGGAC
1170 H T G T S V N C I V E E Y E A R S V Y P Y D S F A L S T G D
274 ATGTGTACATGTCGCCCTTCTACGGCTCGCGAGGGGGCCACGGGAGCACATCGGCTACGGCGCGGGCGCTTCACGAGGTGGAG
1260 I V Y W S P F Y G L R E G A H G E H I G Y A P G R F Q Q V E
304 CACTACTACCCATCGACTCGCGCTTCGGCGCTTCGGAGCGTGACGCGCAACTTCTACGCAACCGCGCACTTCACGGTGGCC
1350 H Y Y P I D L D S R L R A S E S V T R N F L R T P H F T V A
334 TGGGACTGGGCCCCAAGACCGCGCGCTGTGACGCTGGCCAACTGGCCGAGGCGGCGGAGGAGATGACCCGCGACGACGCGCGACGGC
1440 W D W A P K T R V C S L A K W R E A E E M T R D E T R D G
364 TCCITCGGCTTCAGGTGCGGGGCTTCGCGGCTTCGTGTCAGCGAGGTACGCGAGCTGACGCGGCTGACACCTGGCGGACTGC
1530 S F R F T S R A L G A S F V S D V T Q L D L Q R V H L G D C
394

FIG. 19-2

0000004

FIG. 19-3

1620 GTCTCTCGGAGGGCTCGAGGGCCATCGAGCCCATCTACCGGGGGGCTACAGACGACGCGTCTGGCGGGGACAGGCCGAGGTG
 V L R E A S E A I D A I Y R R R Y N S T H V L A G D R P E V
 424 TACCTCGCCCGGGGGGCTTGTGTGGCTTCCGCCCCGCTGATCTCGAGCAGCTGGCGGAGCTGACGGCGGAGCTCGAGCGCTC
 1710 Y L A R G G F V V A F R P L J S N E L A Q L Y A R E L E R L
 1800 GGCCTCGCGGGGCTGTGGGCGCCCGGGCCCGGGCGCTCGGGCGGGCGCTCCCGGGCGGGGACGCGAGCGGCGCG
 G L A G V V G P A A P A A A R R A R R S P G P A G T P E P
 484 GCGTCACGCGGCGGCGACCTGGCCATCACCAGGGGCTGGGGGAGTTTCGGCGGCTTCAGTTCACCTACGACCCACATCCAGCGGCAC
 1890 A V N G T G H L R I T T G S A E F A R L Q F T Y D H I Q A H
 1980 GTCAACGACATGCTGGGCGCATCGCGGCGGCTGGTGGCAGCTGCACAGGACCCGACCTCTGGAGCGAGATGTCGGCGCTGAC
 514 Y N D H L G R I A A A W C E L Q N K D R T L W S E H S R L N
 2070 CCCAGCGCGTGGCCACGGCGCGCTCGGCCAGCGCTCTCGGGCGCATGCTCGGCGAGTGA TGGCATCTCGCGTGGCTGGAGTG
 P S A V A T A A L G Q R V S A R H L G D V Y M A I S R C V E Y
 574 CGCGGGCGGTGTAGTGCAGACTCCATGCGGTGCCCGCGAGCGGCGACGTGCTACAGCGCGCCGCTGGTCACTTCGAGCAAC
 R G G V Y V Q H S H R V P G E R G T C Y S R P L V T F E H N
 2250 GGCACGGCGTGA TCGAGGGCGAGCTCGGGCAGCAGACAGCTCCTCATCTCGGGCGGACCTCATCGAGCCCTGCACCGGCAACCCGG
 G T G V I E G Q L G D D H E L L I S R D L I E P C T G H N R
 634 CGCTACTTTAAGCTGGGGAGCGGTACGTGTACTACGAGGACTACAAC TACGTGGCGCATGGTGGAGGTGCCCGAGACGATCAGACGCGG
 R Y F X L G S G Y V Y Y E D Y N Y Y R M Y E V E T I S T R

664 GTGACCCCTGACCTGCTGGAGGACCGGAGTTCCTGCCCCCTCGAGGTGTACAGCGCAGGAGCTGCCCCGACACGGGCGCTCTCTG 2430
 V T L N L T L L E D R E F L P L E V Y T R E E L A D T G L L
 694 GACTACAGCGAGATCCAGCGGCCCAACCGCTGACGGGCTCAAGTCTACGACATCGACCGGCTGGTCAAGGTGGACCCACACAGCTGGTG 2520
 D Y S E I Q R R H Q L H A L K F Y D I D R V V K Y D H N V V
 724 CTGCTGCGGGCATCGCCCACTTCTCCAGGGCCTCGCGGACGTGGGCGCGCGCTCGGCAAGGTGCTCTGGGTGCCACGGGCGCGCTG 2610
 L L R G I A N F F Q G L G D V G A A V G K Y V L G A T G A Y
 754 ATCTCGGCGCTCGCGGCGCATGGTGTCTCTCTGTCACGCCCTTCGGGGCGCTCGCCATCGGGCTGCTGGTGTCTGGCGGCGCTGGTGC 2700
 I S A V G G M V S F L S N P F G A L A I G L L V L A G L V A
 784 GCCTTCTGCGCTACCGGACATCTCGCGGCTGGGCGCGCACCCCATCGAGGCGCTGTACCCGCTACGACGACGAGCGCTCAAGGAGGAC 2790
 A F L A Y R H I S R L R R R N P M K A L Y P V T T K T L K E D
 814 GCGCTCGACGAGGCGACCTGGAGGAGGCCAAGCTGGACAGGCGCGGGACATGATCCGGTACATGTCATGCTGTGGGCGCTCGAGCAG 2880
 G V D E G D V D E A K L D Q A R D M I R Y M S I V S A L E Q
 844 CAGGAGCACAGGCGCGCAAGAGACAGCGGGCGCGGCTGCTGGCCAGCGCGCTCGGGGCGCATGGCCACGCGCGCGCGCTACACAG 2970
 Q E H K A R K K H S G P A L L A S R Y G A M A T R R R R H Y Q
 874 CGGCTCGAGAGCGAGGACCGCGCGCTGTATCCGCTCCGCGGGGAACAATTAAGATGCGCTTGTGGCAACAGCTCTCGCGTCCG 3060
 R L E S E D P D A L

FIG. 19-4

904
1CT

0000034

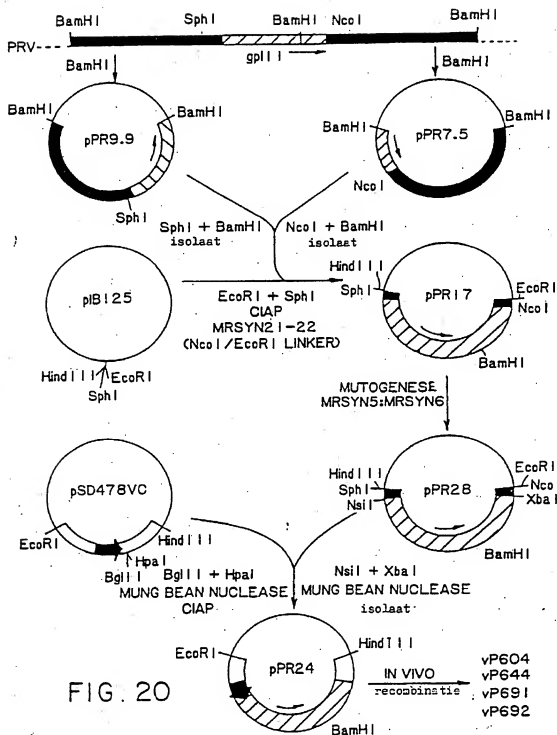


FIG. 20

9900034

ASGGCGACCACTCCGCTGCCGCACACCGCGGTACCGGCTCGCGCGCGGCACGTGACGGCGGCGCTGCTGGTGACGGGTACGTGAC 90
 CGTCGCCCATGTGCCGCTACTAGCAATTAATCGTTTCTGATTACGCCACGCTCGGTGGTTTTTAAACCGGATGGGGGACGGGGGG 180
 CCATTGCCACGGCCATGGCTGGCTCGCGGTGGATGCTCGCTGCTGGCGCTCTACGGCGCGCCATCGCGCGGGCGCGCTGACCE 270
 M A S L A R A N L A L L A L T A A A J A A A P S 350
 ACGACGGCGCTCGACACGCGCCAAACGGGGGGCGCGCGGCAACAGCAGCGAGGGGAGAATCTCGCGCTCTCGCGCGCGCGCGCGCG 350
 T T A L D T T P N G G G G G G N S S E G E L S P S P P P T P A 450
 CCGCGCTCGCGCGAGCGGGGGCGGTCTCGACGCGCGCGGTCTCGCGCGCGCTGGTCTCGCGCAGGAAGCGCGCGGGGAACAACCGG 450
 P A S P E A G A Y S T P P V P P P S Y S R R K P P P R N H N R 540
 ACGCGCTCGACCGCGCAAGGCGCACCGCGCAAGCGCATCGTGTCCGGGAGCGGCTGTTCTCGCGCGCGGTGGGGGAGCGCG 540
 T R Y H G D K A T A H G R K R J V C R E R L F S A R V G D A 630
 GTCAGCTTCGGGTGGCGCTCTTCGGCGCGCGCGGGGAGACTTCGAGGTCCGCTTCTACCGCGCGGGCGGCTTCGCGTCGCGCGACGCC 630
 Y S F G C A Y F P R A G E T F E Y R F Y T R R G R F R S P D A 720
 GACCGCGAGTACTTTGACGAGCGCGCGCGCGCGAGCTCCCGGGAGCGGCTCCTCTTCAGCTCGCGCAACGCGCTCCCTCGCGCGACGG 720
 D P E Y F D E P P P P E L P R E R L L F S S A N S L A N H 810
 GACCGCGCTCGCGCGCTGCTGCTCGAGGGCGAGCGCGGACCGTCCGCAAGCTCTCGGGCAGGTGTCCGTCGCGGTGGCGCGCGCGGAC 810
 D A L A P V Y V E G E R A T Y A N V S G E Y S Y R V A A A D 900
 176 CGCGAGACCGAGGGCGCTACAGCTGGCGCGTGTGTGCGCGCAACGGCACGAGGTCCGGAGCGGCAACGTCTCGCTCCTCTGTACAGC 900
 A E T E G V Y T W R V L S A N S T E V R S A N Y S L L L Y S 990
 206 CAGCGCGAGTTCGGCGCTGAGCGCGCGCGCGCTCCTCTTCGGTGAGCGCTTCGGCGCGGTGTGCTGCTCGCGGACTACTACCGCGGGCG 990
 Q P E F G L S A P P V L F G E P F R A Y C Y V R D Y T P R R 1080
 236 AGCGTGGCGCTGGCTGGTTCGGGAGCAGCACCGGTTGACGCGCGCTTCGTGACCAACAGCAGCGTGGCGGACGAGCTGGCGCGCGCG 1080
 S Y R L R W F A D E H P Y D A A F Y T M S T Y A D E L G R R 1170
 256 ACGCGCGCTTCGCTGGTGAAGCTGACGGCGCGGACGTCCGGCGCTCGCGCGCGGAGCGCGGAGCGGCTCGCGCGGACGCTGGCG 1170
 T R Y S V V N V T R A D V P G L A A D A A D A L A P S L R 1260
 296 TCGAGGGCGGTGGTACCGCGCAGCGTGGCTCGCAGCGCTTCTCGGAGCGCTCGCGCGCGCACGTCACCAACCGGGCGCGGTCTCG 1260
 C E A Y W T R D S V A S Q R F S E A L R P H Y T H P A A Y S 1350
 326 CTGCGCTTCGTGAGGGCTCTGGCGCTCTGCGACGGCTCTGGCTGCGCGCGGAGCGCGCGCTCGCTGGTGGCGACCGCGCGCGGACCG 1350
 V R F Y E G F A Y C D G L C Y P P E A R L A W S D H A A D T 1440
 356 GTCTACCACTCGCGCGCTCGCGGAGCACCGCGCGCTGCTCAAGCTCGGGAGCGCGCGCGCGCTGTGCGGACTCGAGGGCGCGCTGAC 1440
 Y Y H L G A C A E H P G L L N Y S A R P L S D L D G P V D 1530
 386 TACAGCTCGCGCTCGAGGGCTCGCGCTCGAGCTGCGCGCTCTTCGAGGACACGAGCGCTACGACGCGCTCCCGCGGCTCGGTGAGCTGG 1530
 Y Y T C R L E G L P S O L P Y F E D T O R Y D A S P A S Y S V 1620
 416 CCGCGCTGAGCAGCATGCTGCTCATCGCGGCGCGGATCTGCGGCATCGTCTGCTCATCATGCGAGCTGGCTCTACTACGCG 1620
 P Y V S S M J V Y I A G J G I L A J V L Y J M A T C V Y Y R 1710
 446 CAGCGGGGGCGGTGAGCTCGCGCGGCTCG 1710
 Q A G P 1724
 TGTGCGCGCGCGCG

FIG. 2 I

9900034

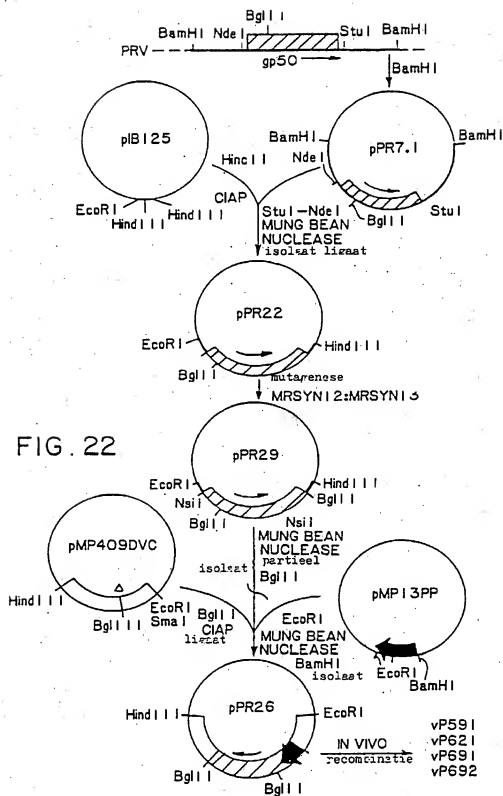
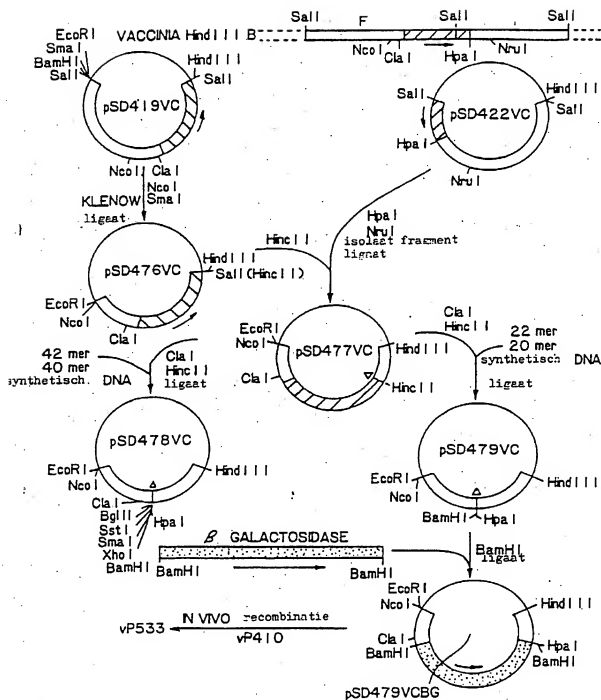


FIG. 22

0000034

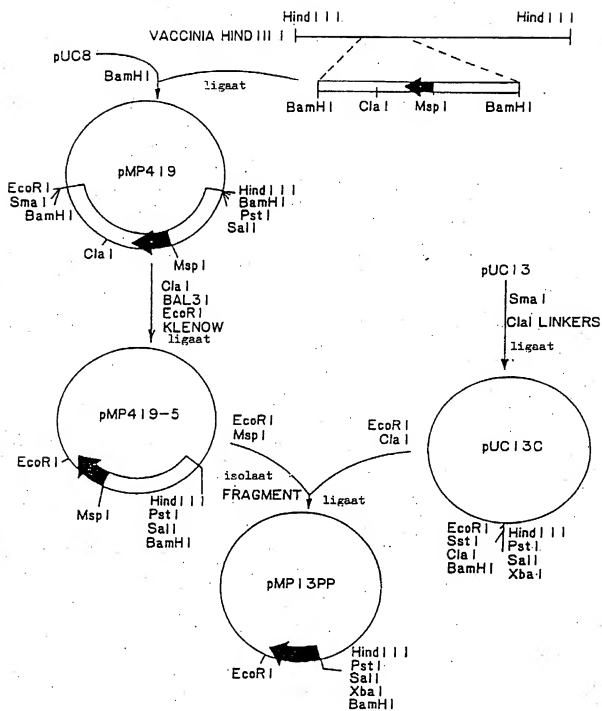
[illegible]

FIG. 24



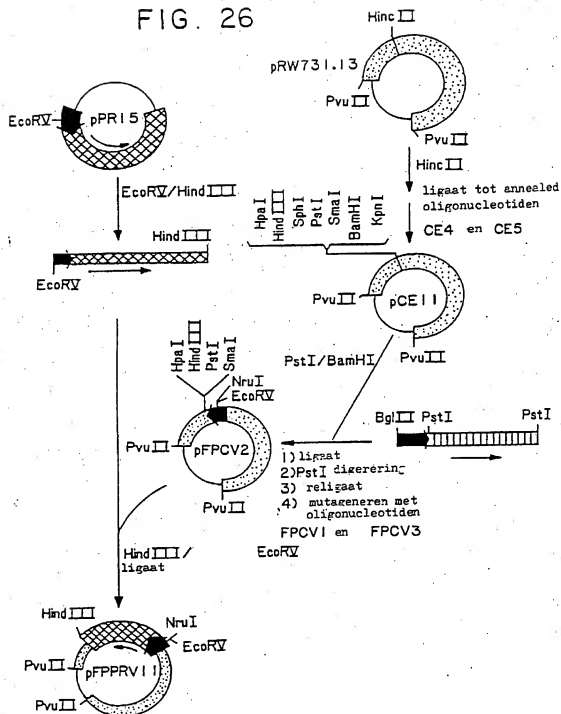
8500034

FIG. 25



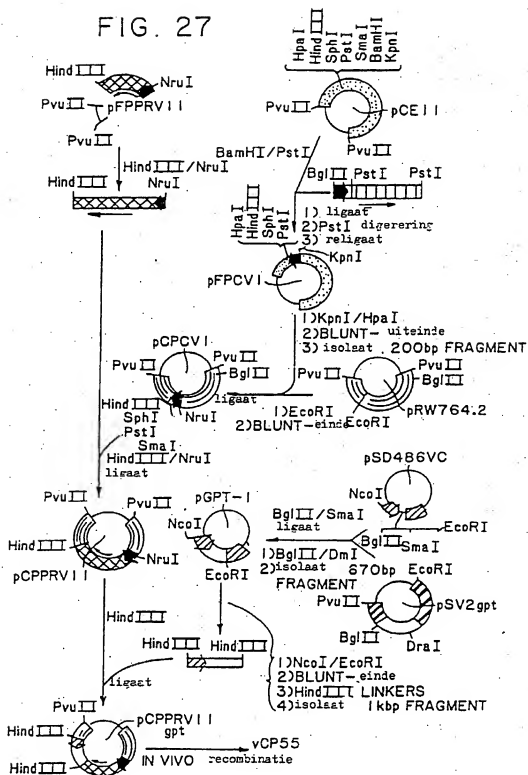
9900034

FIG. 26



0800034

FIG. 27



9900034

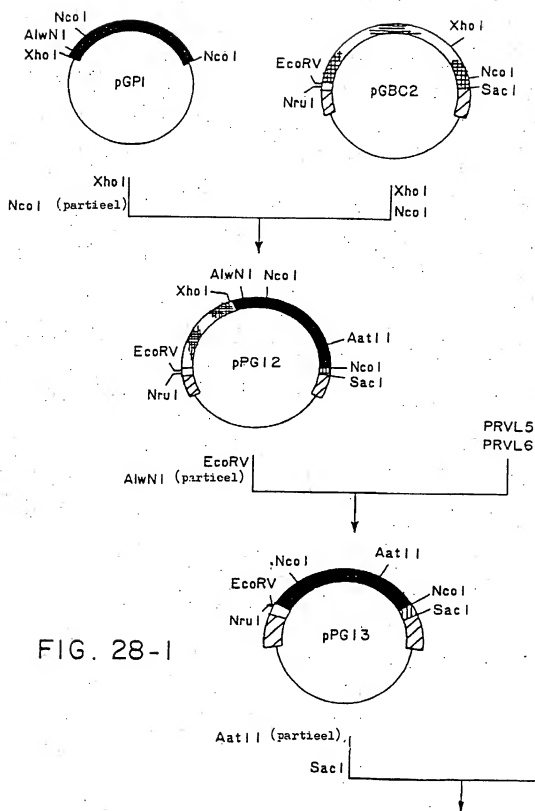
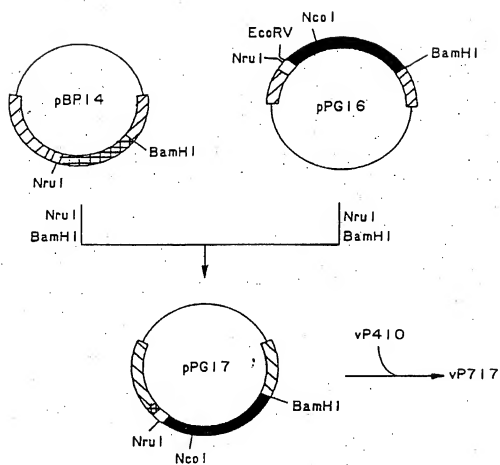


FIG. 28-1

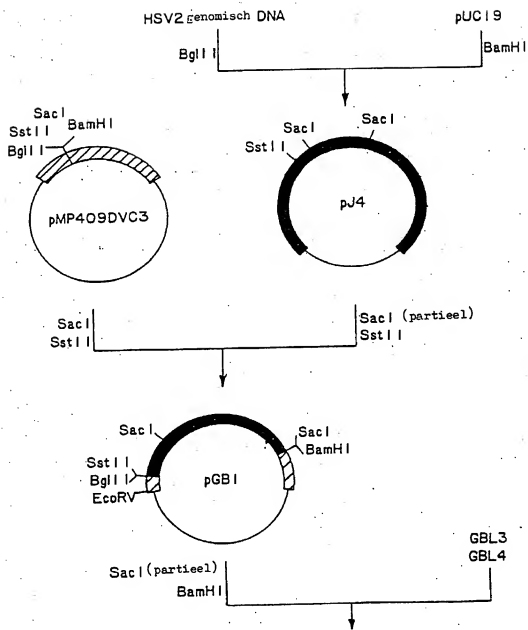
0000034

FIG. 28-2



9900034

FIG. 29-1



00034

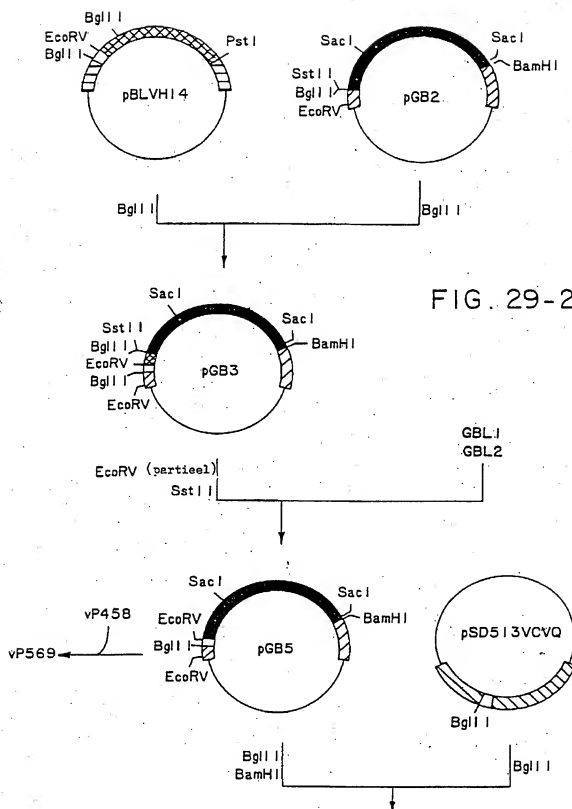


FIG. 29-2

9900034

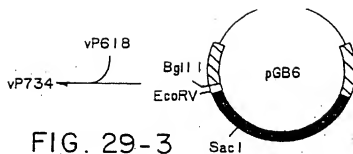


FIG. 29-3

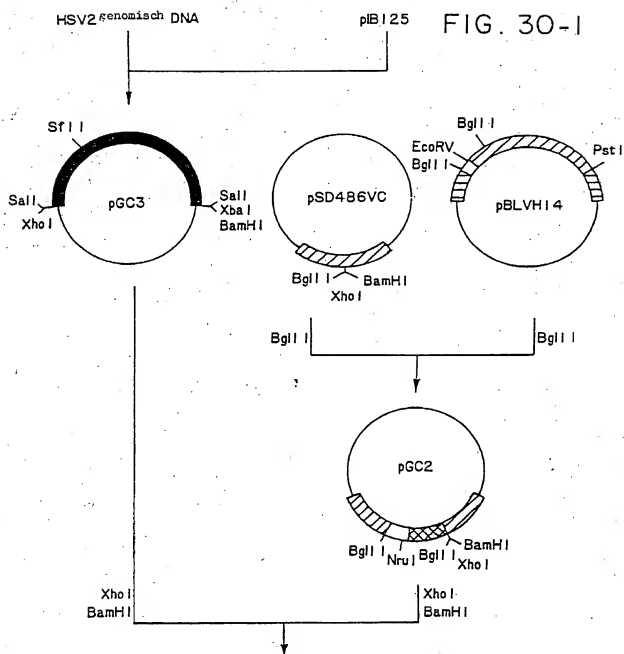
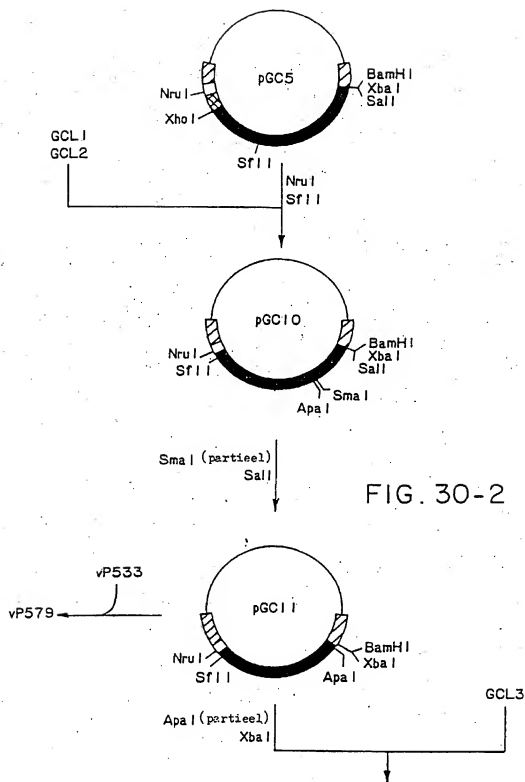


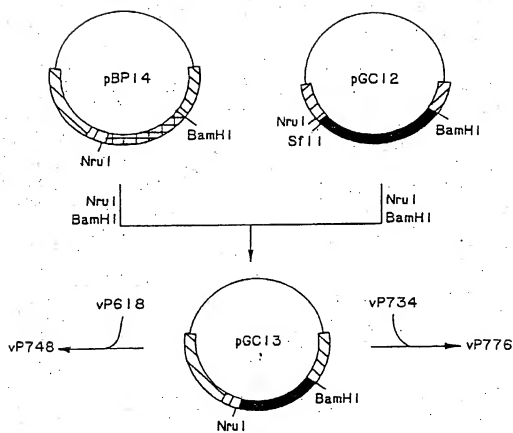
FIG. 30-1

9900034



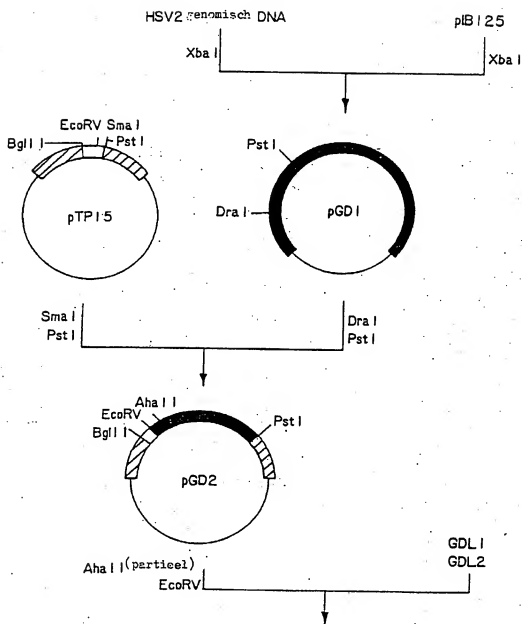
9900034

FIG. 30-3



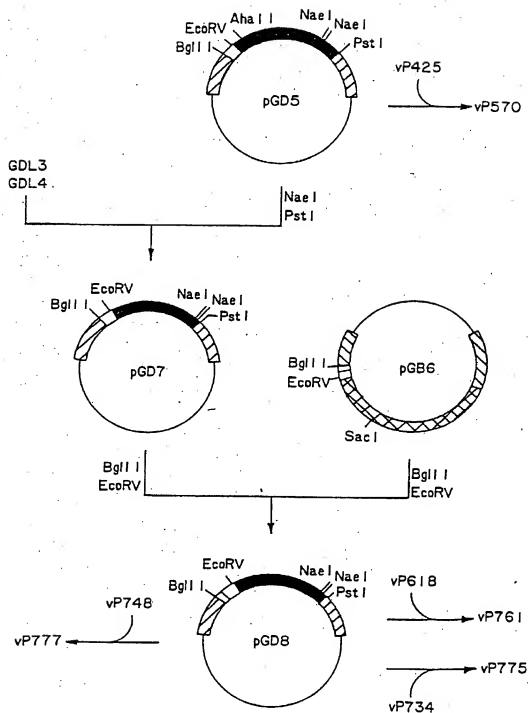
8300034

FIG. 31-1



9900034

FIG. 31-2



3900034

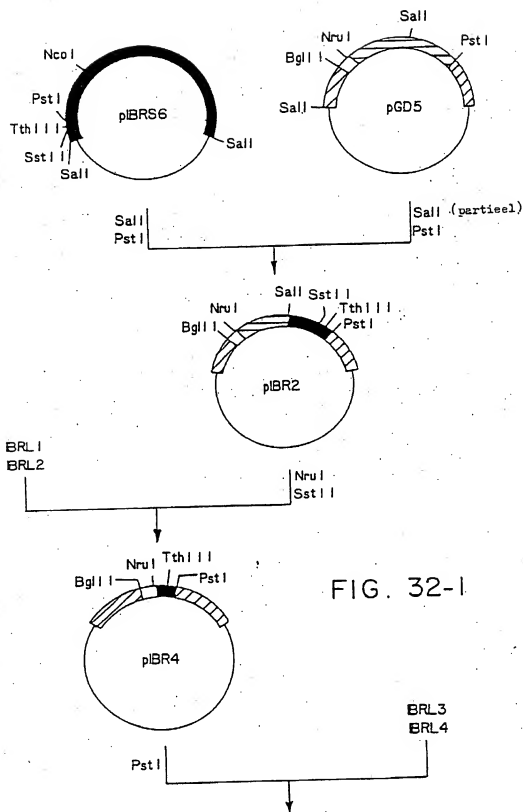


FIG. 32-1

9900034

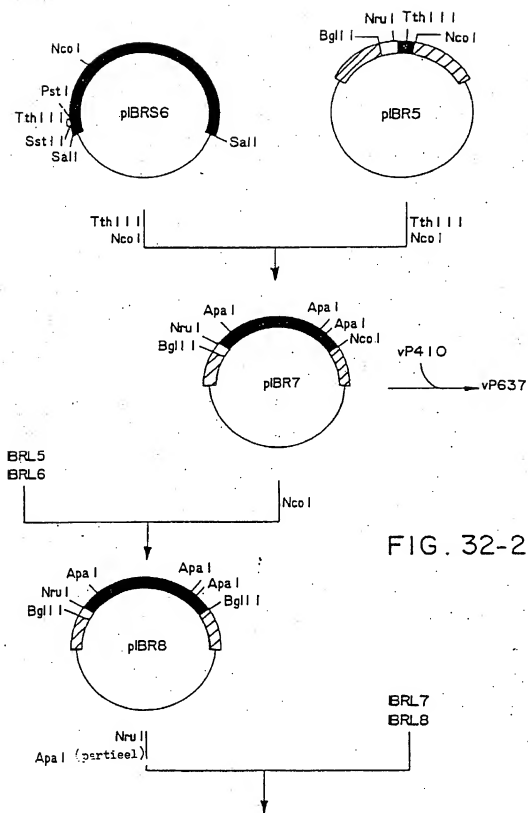
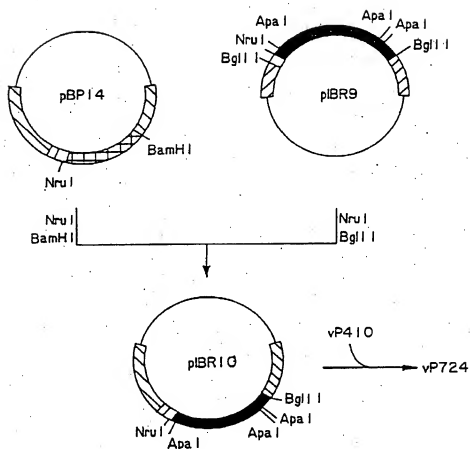


FIG. 32-2

8300234

FIG. 32-3



9900034

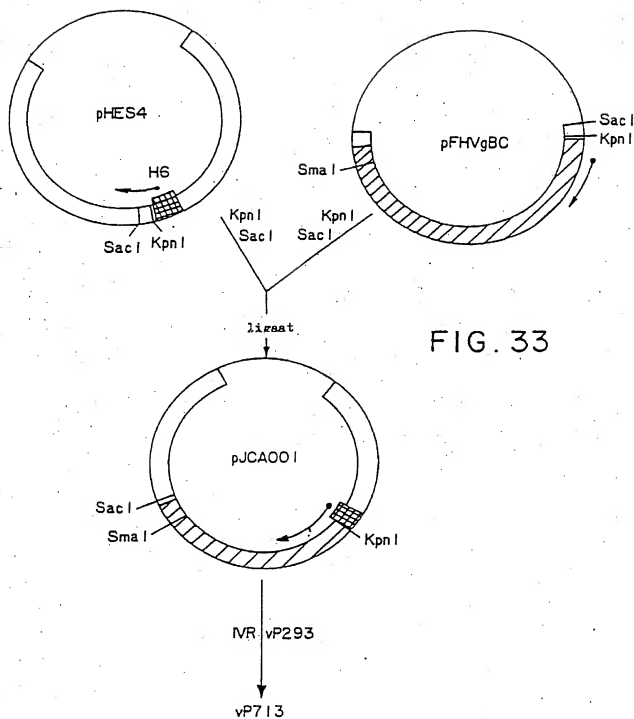


FIG. 33

000034

FIG. 34-1

1 CCCCCCAACACAGCGTTTTTATTTCAGTGTGAGACGTTGGTCTGCTTCCACATTTAAAGAGAATGG
 71 CGGGATTATGTTAAACGTCCACCGGGGTGGTGAGCGGTGAGTAAATTTCAAAGATTTTACTATTTCGG
 141 TGATGATACGTCGTGGCGTCAACAACTCAGCGGTGGCTTGGAAATATATCCGGTGAGCTCATTTCTAGCA
 Sac I
 211 TCTGCCATATTTTCTCCGTCTTTCACTGCGGTGAGTGAAGTCTGTACGCATCTGTATCGCACACGACCG
 Kpn I
 281 GCTAATACAGGTACCCAGATCTGCCACCCGGCATTTATCTAACATACGAAGATCATGTCCACTCGTGG
 M S T R G
 351 CGATCTTGGGAGCGGCGACGAGGAGTCGTTGGCAGGACACACAGTGGCTATTTTCGACAGAGATGTTTT
 D L G K R R R G S R W Q G H S G Y F R Q R C F
 421 TTCCCTTCTACTCGTATTTGCAGCGACTGGCTCCAGACATGGTAAACGATCGTCGGGATTAACAGAC
 F P S L L G I A A T G S R H G N G S S G L T R
 491 TAGCTAGATATGTTTCATTTATCTGGATCGTACTATTTCTAGTCGGTCCCGCTCCAGTAGAGGGTCAATC
 L A R Y V S F I W I V L F L V G P R P V E G Q S
 51
 75

561 TGGAAGCATCGGAACAACCCGGCGGACTGTAGCTACCCCTGAGGTAGGGGTACACCACCAAAACA
G S T S E Q P R R T V A T P E V G G T P P K P 98

631 ACTACAGATCCCAACCGATATGCGGATATGAGGAAGCTCTCGTCGCTCCCAATAGAGGCTAACGGAC
T T D P T D M S D M R E A L R A S Q I E A N G 121

701 CATCGACITTTTATATGTCCACCACTTCAGGATCTACTGTCGGTTAGAGCCACCCACGGGCTC
P S T F Y M C P P P S G S T V V R L E P P R A C 144

771 TCCAGATTATAACTAGGGAATAATTTACCGAGGGTATAGCTGTATATTTAAAGAAATATAGCGCA
P D Y K L G K N F T E G I A V I F K E N I A P 168

841 TATAAATTCGAAGCAATATATATACTATAAAACATTTATGACACGGTATGCTCGGGAGTTCCTATG
Y K F K A N I Y Y K N I I M T T V W S G S S Y 191

911 CCGTTACACCAACCGATATACACACAGGGTTCCTCGTGAAGTTCAAGAGATTACAGATCTCATAGATAG
A V T T N R Y T D R V P V K V Q E I T D L I D R 214

FIG. 34-2

FIG. 34-3

981 ACGGGGTATGCGCTCTCGAAAGCTGATTACGTTCGTAAACAATATCAATTTACGCCCTTGTATCGAGAC
R G M C L S K A D Y V R N N Y Q F T A F D R D 238

1051 GAGGATCCCGAGAACTGCCTCTGAAACCTCCAAGTTCAACACTCCAGAGTCCCGTGGATGGCACACCA
E D P R E L P L K P S K F N T P E S R G W H T 261

BamHI

1121 CCAATGAACATACACAAAGATCGGTGCTGCTGGATTCCACACTCTCGGACCTCTGTAAATGTCATCGT
T N E T Y T K I G A A G F H H S G T S V N C I V 284

1191 AGAGGAAGTGGATGCAAGATCTGTATATCATATGACTCATTTGCTATCTCCACTGGTACGTGATTCAC
E E V D A R S V Y P Y D S F A I S T G D V I H 308

1261 ATGTCTCCATTCTTTGGGCTGAGGGATGGAGCCCATGTAGAACATACACTAGTTATTCTTCAGACAGATTTC
M S P F F G L R D G A H V E H T S Y S S D R F 331

1331 AACAAATCGAGGGATACATCAATAGACTTGGATACGCGATTACAACTGGGGGCACCAAGTTTCTTCGCA
Q Q I E G Y Y P I D L D T R L Q L G A P V S R N 354

1401 TTTTGGAAATCCGCATGTACACTGGCTGGAACTGGACCCCAAGCTGTGGTGGGTATGTACCTTA
F L E T P H V T V A W N W T P K S G R V C T L 378

1471 GCCAAATGGAGGAATAGATGAATGCTACGCCGATCAATATACGGGCTCTATAGATTACAGCCCAAGA
A K W R E I D E H L R D E Y Q G S Y R F T A K 401

1541 CCATATCGCTACTTTTCATCTCCAATACCTCACAATTTGAATCAATCGTATCCGTTTGGGGACTGTG
 T I S A T F I S N T S Q F E I N R I R L G D C A 424

1611 CACCAAGAGGCGCGAGCCATAGACCGGATTTATAGAGTAATATAGTAAACTCATATTCAGCT
 T K E A A E A I D R I Y K S K Y S K T H I Q T 448

1681 GGAACCCCTGGACCTACCTAGCCCGTGGGGATTTCTAATAGCTTTCCGTCCCATGATCAGCAACGAAC
 G T L E T Y L A R G G F L I A F R P M I S N E 471

1751 TAGCAAACTTATATCAATGATTAGCACGTTCCAAATCGCACGGTAGATCTCAGTGCACCTCCTCAATCC
 L A K L Y I N E L A R S N R T V D L S A L L N P 495

1821 ATCTGGGAAACAGTACACGAACAGTAGAGATCGGTCCCATCTTAATCAACATCATAGTTCGGCGGCGAGC
 S G E T V Q R T R R S V P S N Q H H R S R S
 ### # 518
 # # # #

1891 ACATAGAGGGGGTATAGAAACCGTGAACAATGCATCACTCCCTCAAGACCACTCATCTGTGGAATTCG
 T I E G G I E T V N N A S L L K T T S S V E F 541

1961 CAATGCTACAAATTTGCCTATGACTACATACAGCCCATGTAATGAATGTGAGTCGGATAGCCACTGCG
 A M L Q F A Y D Y I Q A H V N E M L S R I A T A 565

FIG. 34-5

2031 CTGTGTACACTTCAGAACGGCAACAATGTCTGTGACAGACACCCCTAAACTCAATCCGGTGGGGTG
 W C T L Q N R E H V L W T E T L K L N P G G V 588

 2101 GTCTGATGGCCCTAGAACGTCTGTATCGCGCCCTACTTGGAGATGCCCTGCGGTACACAAATGTG
 V S M A L E R R V S A R L L G D A V A V T Q C 611

 2171 TTACATTTCTAGCGGACATGCTCTATATCCAAATTTCTATCGGGTGACGGGTTTCATCAACGACATGTA
 V N I S S G H V Y I Q N S M R V T G S S T T C Y 635

 2241 CAGCGCCCTCTTGTTCCTTCGTGCGCCCTCAATGACTCCGAATACATAGAGGACAACTAGGGGAAAC
 S R P L V S F R A L N D S E Y I E G Q L G E N 658

 2311 AATGAACCTTCGTGGACGAAACTAATTGAGCCTTCGACTGCAATATAAGCGGTATTTTAAGTTTG
 N E L L V E R K L I E P C T V N N K R Y F K F 681

 2381 GGCAGATTATCTATTTTGGAGATTATGCGTATGTCGTAAGTCCCGCTATCGGAGATAGAACGTAT
 G A D Y V Y F F E D Y A Y V R K V P L S E I E L I 705

 2451 AAGTGCCTATGTGAATTTAATCTTACTCTCCCTAGAGGATCGTGAATTTCTCCCACTCGAAGTTTATACA
 S A Y V N L N L T L L E D R E F L P L E V Y T 728

 2521 CGAGCTGAGCTGGAGATACCGGCCCTTTTGGACTCAGCGGAGATTCAACGCCGCAACCACTCCACGCCT
 R A E L E D T G L L D Y S E I Q R R N Q L H A 751

- 2591 TAAATTTATGATATAGACAGCATAGCTACAGTGGATAATATCTTGTCTCATCATGCGTGGTATGGCAA
L K F Y D I D S I V R V D N N L V I M R G M A N 775
- 2661 TTTTTCAGGGACTCGGGGATGTGGGGCTGGTTTCGGCAAGTGGTCTTAGGGGCTGCCAGTCCGTA
F F Q G L G D V G A G F G K V V L G A A S A V 798
- 2731 ATCTCAACAGTATCAGCGGTATCATCATTTCTTAACACCCATTTGGAGCATTTGGCGTGGGACTGTAA
I S T V S G V S S F L N N P F G A L A V G L L 821
- 2801 TATTAGCTGGCATTCGTGGAGCATTCCTGGCATATCGTATATATCTATCTAGTACGTCCAAATCCAAATGA
I L A G I V A A F L A Y R Y I S R L R A N P M K 845
- 2871 AGCCTTATATCCTGTGACGACTAGGAATTGAAACAGACGCTAAGCCGCTCAACGGCTGGTGGGAT
A L Y P V T T R N L K Q T L R A R S T A G G D 868
- 2941 AGGACCGGGAGTCCGATCCTTCGATGAGGAAAAGCTAATGCRAGGCAAGGAGATGATAAATATATCT
S D P G V D D F D E E K L M Q A R E M I K Y M 891
- 3011 CCCTCGTATCGGCTATGGAGCAACAGAACATAAGCGGATCAAAAGCATATAGGCCCCAGCGATCCCTAAC
S L V S A M E Q Q E H K A M K K N K G P A I L T 914

9900034

3081 GAGTCATCTCACTAACATGGCCCTCCGTCGCGTGGACCTAAATACCAACGCCCTCAATAATCTTGATAGC
S H L T N M A L R R G P K Y Q R L N N L D S 938

3151 GGTGATGATCTGAACAAATCTTGCTCTAACCAACGACCATCTCTAAATTTTTATCCACAAAAAAGT
G D D T E T N L V --- 947

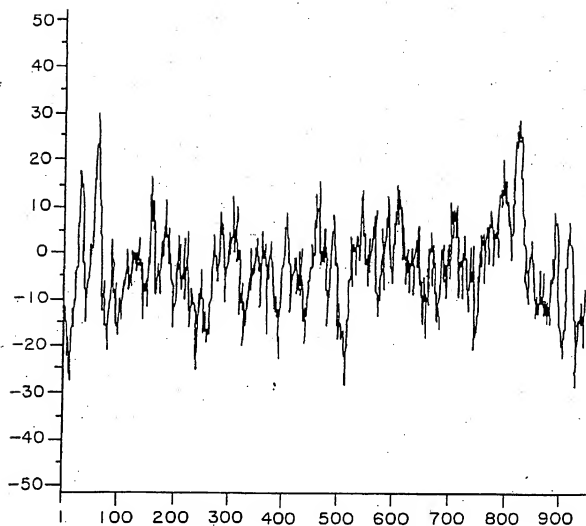
3221 TAGAGATAATAAATTTTGAAGCTCAAAAATATCCTGTAAATGTCATCATTTCTCCGCCCATTCACGTCACGG

3291 TCTCTTTAAATAACCGGTTTGAGGGTTAGGTACACATTTCTCTCGCGCGGATCAATCCAAACACAGGA

3361 AGGCTAACACTTTTCCATCGATAACATATCATGAGCTC
Sac I

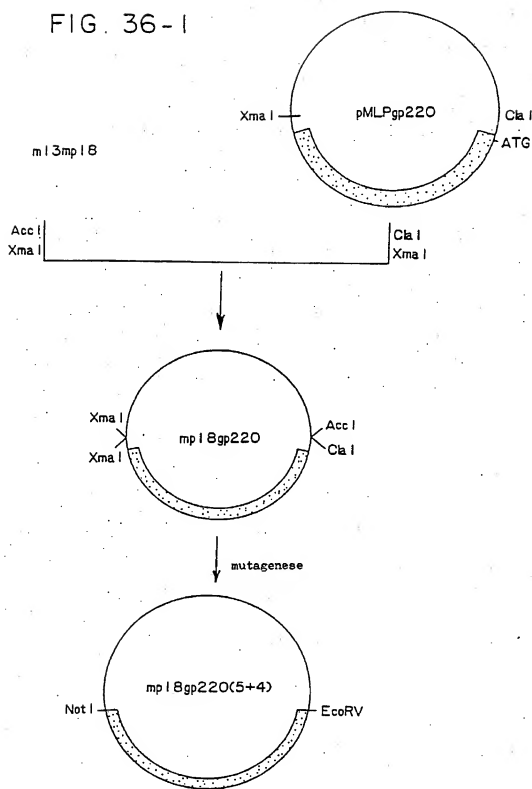
FIG. 34-7

FIG. 35



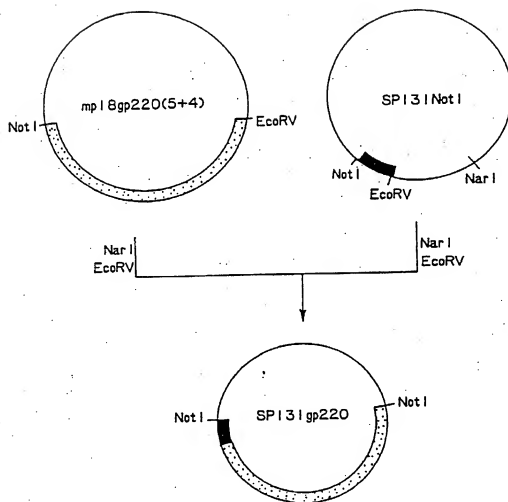
9900034

FIG. 36-1



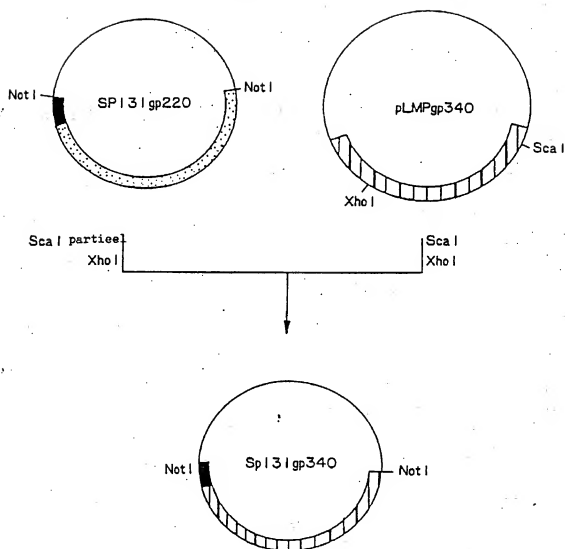
0000034

FIG. 36-2



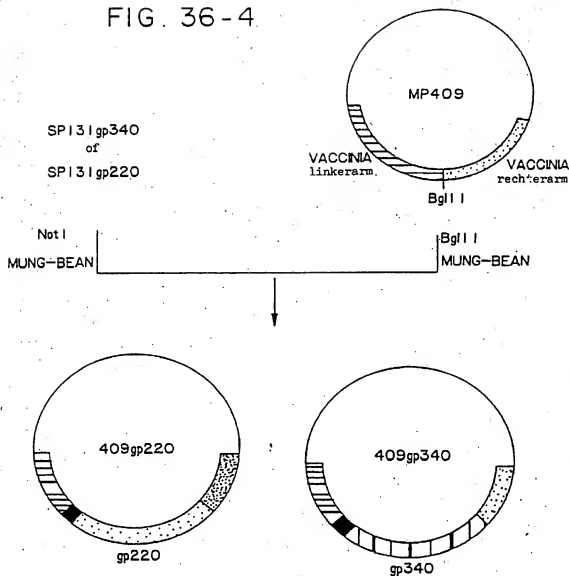
9900034

FIG. 36-3



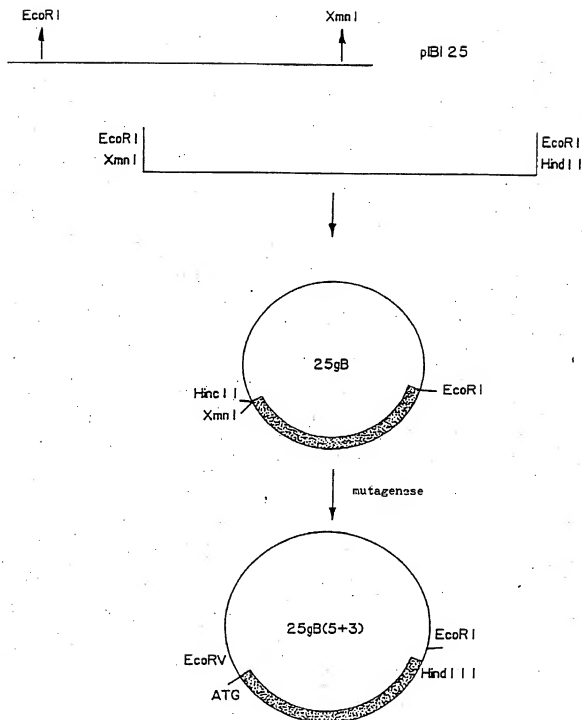
0000034

FIG. 36-4



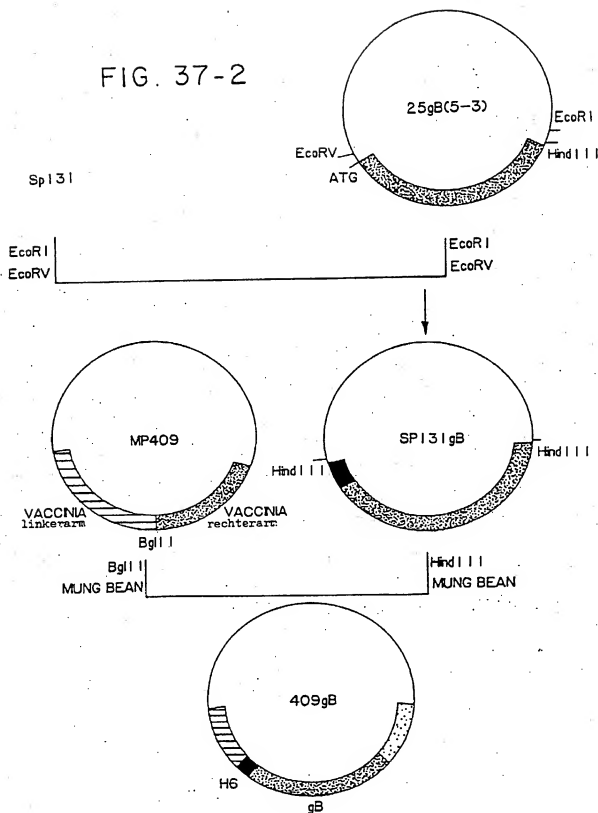
9900034

FIG. 37-1



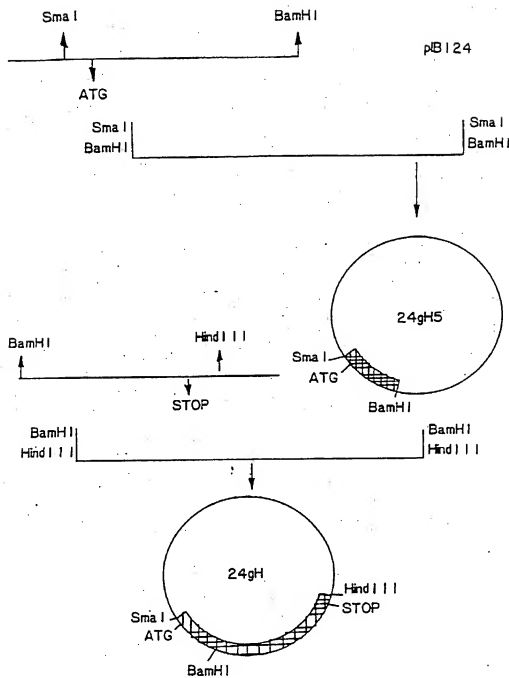
0000034

FIG. 37-2



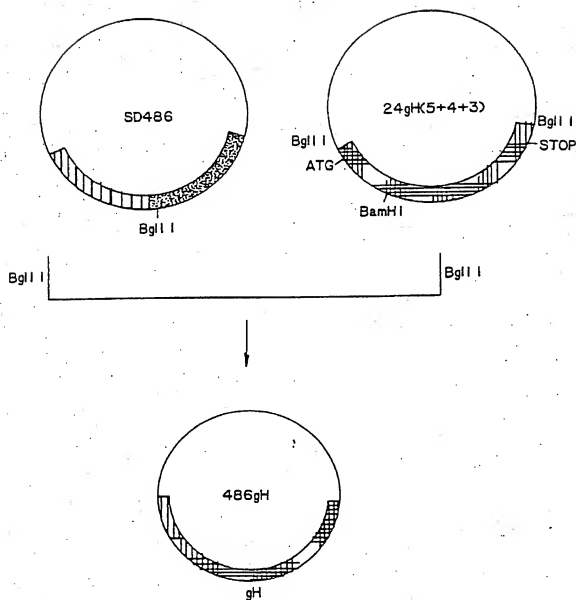
9900034

FIG. 38-1



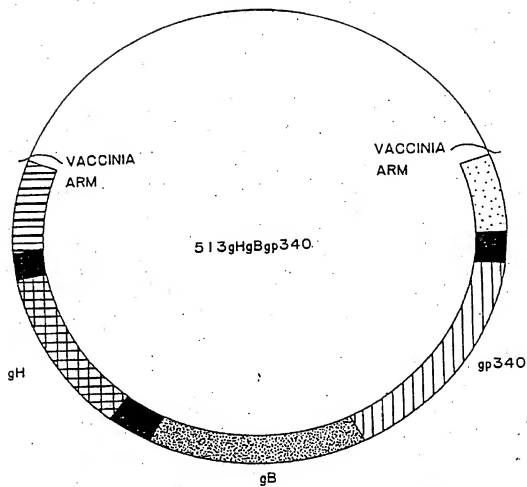
8800034

FIG. 38-2



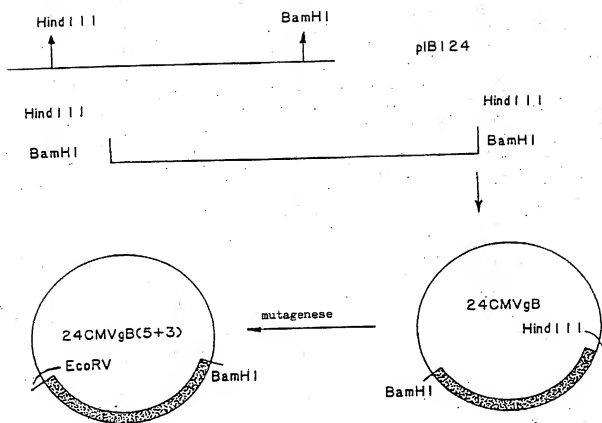
9900034

FIG. 39



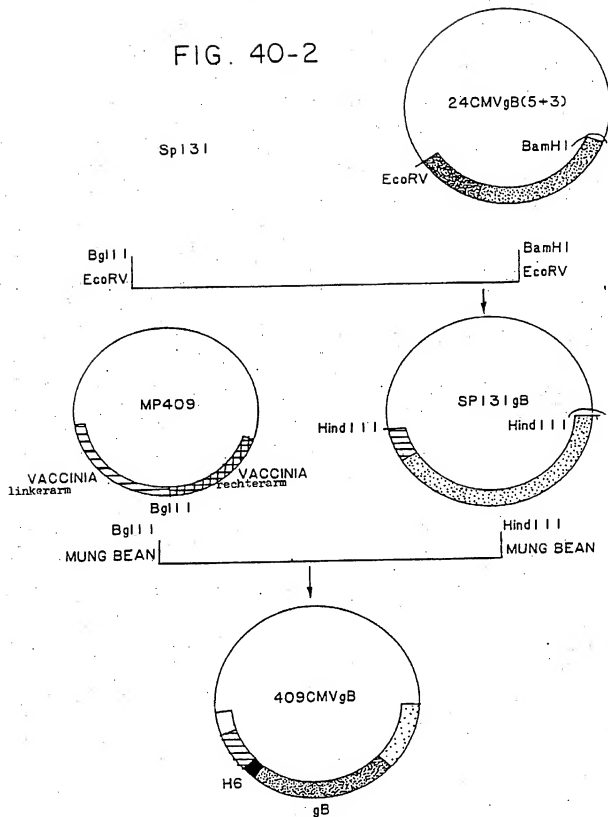
9600034

FIG. 40-1



9900034

FIG. 40-2



9900034

1 ACGATCTATATGCTTATCTAGCCCTCTGGGCCCGGTAGATGCCGTGAITATCTTGACTCTTTTCGATGAACCTCCGCCCTTGGTGGAGAGGAACCGTTACCGCT
 H N L I M L I L A L V A P V A G S M P E L S L T L F D E P P L V E T E P L P P >
 121 CTCGCCGATGTTCCGAGTACCGAGTAGATATTCGAGGCGGCTGGGTGCTCCGATCGGGCGGTGCACTGGAGGCTCTGTGGACCTCGCGGGAACCTGCTCGGCCCGCCGACA
 L P D V S E Y R V E Y S E A R C V L R S G G R L E A L W T L R G H L S V P T P T >
 241 CCGCCGGGTACTACCAAGCTGGAGGGTACGCGATCGATGCCGCCGCGTGGAGGACATCTCCGAAAGCCTCGTCCGAAACGCTACTGGCTCCGGACTATCGTGTTCGCCAA
 P R V Y Y Q T L E G Y A D R V P T P V E D I S E S L V A K R Y U L R D Y R V P D >
 361 CGGCAAAAGCTGTGTGTTCTACTTTCCGCCCTGCCATCAATGCCAACTTATATGATAGATGCCAACCCCGTGCCTGTGCTTGGGTTCCCTGTGGAGCTCGTAGAGGACATC
 R T K L V L F Y F S P C M Q C Q T Y Y V E C E P R C L V P V V P L W S S L E D I >
 481 GAACCACTATGTTGGAAGATCGCCGCTCATGGCTACTACGGCTCAGCATTAAGTCGGCGGAGTACGCTGATGATGGTGGAGTATCAAGTGTTCGGGGCTGATGTGAA
 E R L L F E D R R L M A Y Y A L T I K S A Q Y T L H M V A V I Q V F M G L Y V >
 601 GGTTCGCTGCACCGACATTTCCCTGGATGTTTCGGACCAATGGTGA
 G V L H R H F P W M F S D Q >

FIG. 41

000034

9900034

1 ATGCTACCCGGGAGCCTCCGGAACCTCTCCGACCTGCCTGTGTGGTGCTGGAGGTGGGGGCGCTACGGAGAGAGAGACCGGCTTACTTACGTCCGGCTGTGT
 M L R R G S L R N P L A T C L L V V L G V V A A A T E T R E P T T F T C G C Y >

121 ATTCAAAATCATGTGAAGGTCCGGTGAACCTATGGACAATCCCTCGCTAGACTTTCCGGGCTTGGCTTACACGAGGTGAAMATCAGGAAGGACCCGGAGCCC
 I Q N H V L K G A V K L Y G Q F S P K T L R A L A W L H D G E N H E R H R Q P >

241 ATCCTGTGGAGGACCCGCGACAGCTACGAGGCGCTACATTCTGTGCCACGGAGCTATGCCGCGGAGGAGAACCCGGAACCTATCTGTACCTTACACTCCGCTCC
 I L V E G T A T A T E A L Y I L L P T E L S P P E G N R P R N Y S V I L T L L A S >

361 CGGGATTGTATGAACCTTCTGTGTCCGGTATACGATCCGGGACCGCCGATGGGCTTTTGTAGACTTGACTACCTCTGGTATCTAGGCGACTACGGGGGTACTAAMATTAT
 R D C Y E R F V C P V Y D S G T P M G L L H N L T Y L W Y L G D Y G A L L K I Y >

481 TTCGGACTGTTTCCCGGGGCTGTGTCACTACCCGATCCCTCTCTGATGTGGTATATCCACCTCCGAAAT
 F G L F C R G C V I T R S L L L I C G Y Y P P R E >

FIG. 42